

Università degli Studi di Napoli “Federico II”  
Facoltà di Medicina Veterinaria



Corso di Dottorato in Scienze Cliniche e  
Farmaco-tossicologiche Veterinarie  
XXI ciclo

Tesi di Dottorato in Oncologia mammaria canina

**“Utilizzo di una Superossidodismutasi modificata ottenuta  
in forma ricombinante (rMnSod) come agente  
antineoplastico e marker tumorale per neoplasie  
mammarie canine estrogeno-positive”**

Relatore  
Prof Marco Russo

Candidato  
Dr Alessandro Sica

## INDICE GENERALE

INTRODUZIONE-----	pag 4
➤ Richiami di fisiologia	pag 4
➤ Cenni di anatomia	pag 6
➤ Eziopatogenesi delle lesioni mammarie	pag 7
➤ Stato dell'arte in oncologia	pag 8
➤ Le SOD in oncologia	pag 10
➤ La rMnSod	pag 11
➤ Scopo del lavoro	pag 15
NEOPLASIE MAMMARIE NEL CANE-----	pag 17
➤ Eziologia della patologia neoplastica	pag 17
➤ Teoria genetica	pag 18
➤ Virus oncogeni	pag 19
➤ Agenti fisici	pag 20
➤ Anomalie congenite ed immunitarie	pag 20
➤ Neoplasie ormono-indotte	pag 21
➤ Recettori ormonali	pag 21
➤ Istologia e classificazione	pag 23
MATERIALI E METODI-----	pag 28
➤ Casi clinici	pag 30
➤ Fase di sperimentazione	pag 31
RISULTATI E DISCUSSIONE-----	pag 34
➤ Esami diagnostici	pag 34
➤ Staging diagnostico	pag 35
➤ Risultati esperimenti	pag 36
➤ Risultati primo periodo sperimentale	pag 43

- Risultati secondo periodo sperimentale pag 45
- Discussione pag 46

## COMMENTO E CONCLUSIONI----- pag 49

- Utilizzo dei marker in Medicina Veterinaria pag 49
- Prospettive di studio pag 50
- Utilizzo terapeutico pag 51

## FIGURE E TABELLE

- Figura numero 1 pag 4
- Figura numero 2 pag 11
- Figura numero 3 pag 12
- Figura numero 4 pag 14
- Figura numero 5 pag 23
- Figura numero 6 pag 25
- Figura numero 7 pag 28
- Figura numero 8 pag 28
- Figura numero 9 pag 34
- Figura numero 10 pag 37
- Figura numero 11 pag 38
- Figura numero 12 pag 39
- Figura numero 13 pag 40
- Figura numero 14 pag 41
- Figura numero 15 pag 42
- Tabella numero 1 pag 26
- Tabella numero 2 pag 30
- Tabella numero 3 pag 36

## BIBLIOGRAFIA----- pag 53-63

## Capitolo 1

### INTRODUZIONE (1-1)

L'oncologia riveste un ruolo di estrema rilevanza nella Medicina Veterinaria sia come branca a sè per la notevole incidenza delle neoplasie nei diversi settori e campi di applicazione, sia come modello di studio per vari tumori descritti anche in Medicina umana (Ravdin et al, 2007).

Tra le varie specie domestiche, a manifestare la più spiccata suscettibilità nei confronti di processi morbosi a carattere neoplastico è sicuramente quella canina nella quale i tumori delle ghiandole mammarie rivestono un ruolo di primo piano in modo particolare negli individui di sesso femminile e ciò in virtù soprattutto delle peculiarità endocrine e fisiologiche della sfera genitale (Engenvall et al, 2005).

### RICHIAMI DI FISIOLOGIA (1-2)

Da un punto di vista riproduttivo, la cagna presenta un ciclo che si ripete con una sola manifestazione estrale (monoestrale) ogni sei mesi circa (stagionalità non rigida fatte salve alcune razze) ad ovulazione spontanea di multiple formazioni follicolari che cade di solito tra la fine del proestro (8-12 giorni, limiti 3-20) e l'inizio dell'estro (2-6 giorni, limiti 1- 10); ne consegue la formazione di diversi corpi lutei che si mantengono attivi e secernenti per tutta la durata del diestro (2 mesi in caso di gravidanza, 3-4 mesi in caso di pseudociesti) indipendentemente dal fatto che si verifichi o meno la condizione gravidica (Mattheeuws et al, 2008).

Il controllo del ciclo estrale è assicurato dall'asse Ipotalamo-Ipofisi-Ovaio a sua volta

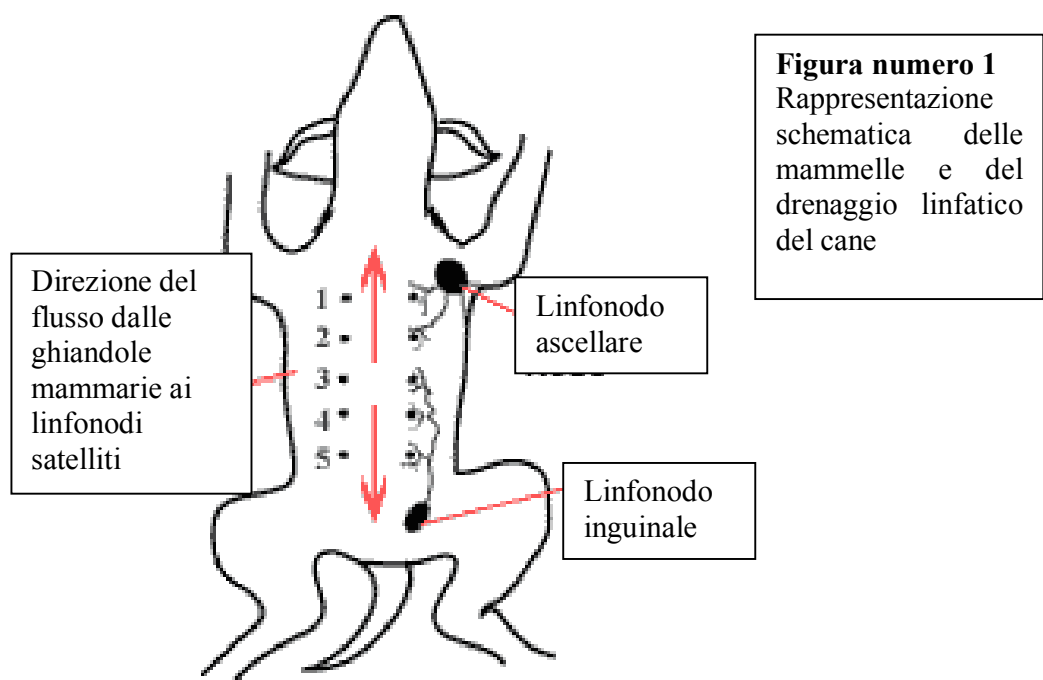
regolato da stimoli sensoriali elaborati dalla corteccia cerebrale che attraverso il Sistema Dopaminergico di inibizione o stimolazione dell'Epifisi, con variazioni circadiane nell'incremento di Melatonina, determina tutti quei meccanismi neuroendocrini che comportano la produzione dei fattori di rilascio ipotalamici (GNRH, FSH-RH, LH-RH) che a loro volta determinano incremento ipofisario di Follicolina (FSH, Follicolo-Stimulating Hormone) e Luteina (LH, Luteinising Hormone). La prima agisce sulle cellule della granulosa dei follicoli ovarici con conseguente sviluppo mitotico e disposizione su multistrati, antralizzazione e sintesi di Estradiolo che agisce dando luogo tanto a manifestazioni comportamentali (attenzione e accettazione nei confronti dei maschi) quanto a modificazioni anatomiche e funzionali del canale genitale (scoli utero-tubarici, iperplasia endometriale, cheratinizzazione vaginale). L'ormone luteinizzante interviene invece nei processi di selezione e di atresia dei follicoli ovarici a livello dei quali determina trasformazione delle teche in senso secretivo con Scoppio dei follicoli maturi di Graaf, formazione e mantenimento del Corpo Luteo e produzione di Progesterone; quest'ultimo svolge un ruolo fondamentale nella depressione immunitaria ineludibile per il riconoscimento materno-fetale della gravidanza, nella quiescenza miometriale e nell'ispessimento dell'endometrio di cui potenzia l'attività ghiandolare. Mentre nelle altre specie è possibile distinguere un corpo luteo gravidico da uno ciclico (a seconda dell'avvenuta o meno gravidanza), nei canidi tali strutture sono indipendenti dalla fecondazione e mantengono la propria attività secretiva per tutto il periodo del diestro con e senza accoppiamento o gestazione. Nel momento in cui tale ormone raggiunge i massimi livelli (a circa un mese dall'ovulazione) comincia anche ad esercitare il suo "feed-back" positivo nei confronti della adenoipofisi per il rilascio di Prolattina, così

come in sede ghiandolare mammaria induce stimolazione in senso trofico e galattorrico (Doleiel et al, 2004)

Ne risulta una condizione parafisiologica in cui in media due volte l'anno ogni soggetto intero o avente almeno un ovaio funzionante si ritrova sotto stimolazione progestinica per un periodo variabile tra i 60 ed i 120 giorni la qual cosa si associa ad increzione protratta di Prolattina con turgescenza delle dieci ghiandole mammarie (due toraciche, due addominali ed una inguinale per ciascuna catena) e galattorrea protratta senza adeguati trattamenti farmacologici (Riganti JC, 2001).

### CENNI DI ANATOMIA (1-3)

Le ghiandole mammarie sono organi pari che nella cagna si estendono sulla linea ventrale del corpo dal torace all'inguine con una disposizione che permette di definire per ciascun lato in senso cranio-caudale due mammelle toraciche, distinte in craniale e caudale, due mammelle addominali, anch'esse divise in craniale e caudale e una inguinale.



In linea di massima si possono definire quattro componenti fondamentali di ciascuna

ghiandola e cioè il capezzolo con lo sbocco dei dotti papillari (in numero variabile da 6 a 12), la cute ricca di ghiandole sebacee e glabra solo nell'areola, la tela sottocutanea in cui decorrono vasi e nervi ed il corpo ghiandolare. Dal punto di vista istologico ogni mammella è costituita dagli alveoli che rappresentano le unità secernenti e dal sistema duttale formato dai dotti intralobulari, interlobulari, lattiferi e della papilla. Gli alveoli risultano rivestiti da epitelio cubico semplice separato dalla membrana basale da cellule mioepiteliali fondamentali nello svuotamento degli acini ghiandolari. Da ciascun alveolo si dipartono i condotti alveolari rivestiti da epitelio cilindrico non secernente che convergono nei dotti lobulari rivestiti da epitelio pluristratificato e che drenano nei dotti interlobulari e successivamente in quelli lobari. Questi ultimi confluiscono nei dotti galattofori che terminano nella cisterna del latte.

L'apporto ematico è assicurato dalle arterie toracica interna, intercostale ed epigastrica craniale per le mammelle toraciche ed addominali craniali, dalle arterie epigastrica caudale e pudenda esterna per le restanti ghiandole. Il drenaggio venoso è garantito dalle vene toraciche ed intercostali cranialmente e dalla pudenda posteriormente, mentre quello linfatico (Hansen NM, 2004) ha come prime stazioni i linfonodi ascellari e sternali craniali per le prime tre mammelle, quelli inguinali superficiali per le altre. Non sono descritte comunicazioni linfatiche controlaterali mentre esistono connessioni tra le mammelle toraciche e quelle addominali (Matos, 2006).

#### EZIOPATOGENESI DELLE LESIONI MAMMARIE (1-4)

Poichè anche nella specie canina è stata dimostrata la capacità delle cellule degli acini ghiandolari mammari di secernere sostanze ad azione GH-simile (Mol et al, 1995) a completamento di ogni ciclo estrale ciascuna catena mammaria subisce uno stimolo

proliferativo di rilevanza non trascurabile che può soggiacere alla trasformazione in senso maligno della stessa (Perrot-Appianat et al, 1985). Da questo punto di vista, mentre l'estradiolo sembra svolgere la propria azione direttamente sulla citogenetica cellulare mediante alterazioni genomiche dirette, il progesterone esercita effetti cumulativi di stimolo protratto iperplastico (Van Garderen et al, 1999). Da un punto di vista puramente statistico, non si riscontrano sostanziali differenze tra le localizzazioni neoplastiche alle mammelle situate in posizione caudale (inguinale e addominali posteriore e anteriore) rispetto a quelle craniali (toraciche posteriore ed anteriore), mentre diversa risulta l'evoluzione del processo morboso anche in virtù delle stazioni linfatiche (Pereira et al, 2003) e dell'irrorazione.

#### STATO DELL'ARTE DELL'ONCOLOGIA (1-5)

Attualmente, l'attenzione degli oncologi è rivolta allo studio di molecole capaci di superare da un lato i limiti della chemioterapia tradizionale in fatto di specificità e selettività (Novosad, 2003), dall'altro le barriere temporali della diagnosi tardiva con tumori evidenziati spesso in fase di già avanzata diffusione (Owen, 1979). In tal senso si possono inquadrare le tre caratteristiche principali che un valido e moderno farmaco antineoplastico deve garantire: la citotossicità, la specificità e la selettività.

Per citotossicità intendiamo la capacità di una determinata sostanza di indurre necrosi su precise linee cellulari (nello specifico cellule mammarie tumorali) sia “in vitro” che “in vivo”, tanto su tumori indotti quanto in quelli spontanei; la specificità si può invece inquadrare come la caratteristica di captare ed interagire con strutture maligne fin dalle fasi iniziali della trasformazione neoplastica; la selettività rappresenta infine la possibilità che il farmaco in questione possa esprimere la sua azione esclusivamente su



cellule tumorali lasciando intatte tutte le altre sane presenti nell'organismo.

In questa ottica, sia i tumori al seno della donna che i carcinomi mammari della cagna sono nella stragrande maggioranza dei casi ormono-attivi (Riganti, 2001) e l'isolamento di proteine capaci di interagire coi recettori per estrogeni e progesterone (Elling et al, 2004) presenti sulla membrana cellulare dei citotipi maligni, può rappresentare di grande ausilio nella diagnosi e nel trattamento di tali lesioni (Simon, 2008).

E' oramai riconosciuta dalla bibliografia internazionale l'ipotesi genetica come cardine eziopatogenetico dell'insorgenza tumorale (De Las Mulas et al, 2003); nella stragrande maggioranza di casi si verificano aberrazioni cromosomiche che soggiacciono alla trasformazione in senso cancerosa delle cellule (Bishop JM, 1987). Queste ultime a loro volta, grazie al mutato genoma, sono capaci di sintetizzare differenti fattori crescita (TGF, FGF2 ecc.), metaboliti ad azione neoangiogenetica (VEGF, Angiomedina, Endotelina) (Patel, 1997) così come sostanze (ne è un esempio la *Metalloproteinasi*) che permettono l'evasione dal sito primario e la diffusione organica del processo (Bagheri-Yarmand et al, 2003; Evenson et al, 1993). Altri eventi vengono messi in atto in maniera differente a seconda delle linee cellulari coinvolte per by-passare i meccanismi difensivi dell'organismo (circonscrizione infiammatoria, sequenze antiangiogenetiche ecc.) ed in tal senso notevole rilevanza riveste il cosiddetto "sistema da distress ossidativo" (Arbiser et al, 2002); a causa della loro immaturità, le cellule neoplastiche possiedono dei corredi enzimatici incompleti o comunque scadenti e questo fa sì che risentano in maniera clamorosa dell'azione di enzimi comunemente presenti nei tessuti organici, le Superossidodismutasi (SOD), che trasformano i radicali liberi, prodotti del catabolismo cellulare e quindi molto abbondanti all'interno di strutture in intensa attività mitotica, in

perossido di idrogeno (Oberley et al, 2004, Tzu-Chao et al, 2007).

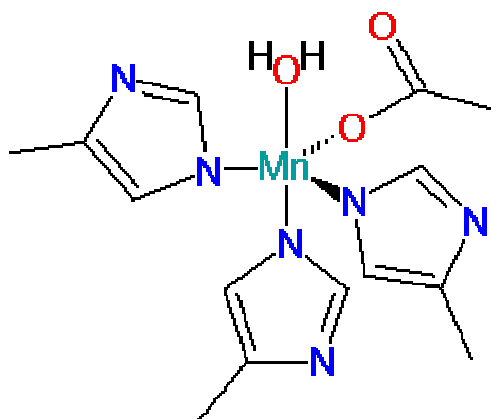
## LE SOD IN ONCOLOGIA (1-6)

Numerosi tumori si caratterizzano per la produzione di isoforme modificate di SOD che entrano in gioco nei meccanismi autocrini di inibizione di crescita (Mancini et al, 1991) e recentemente una isoforma estratta da coltura cellulare ottenuta da liposarcoma umano e caratterizzata da un atomo di manganese in posizione stechiometrica centrale (figura numero 1) ha mostrato sia “in vitro” che “in vivo” notevole potere citotossico (Mancini et al, 2006), oltre che potenzialità di selettività sia per il marcato tropismo per cellule sovraesprimenti determinati siti recettoriali, sia per la sua fisiologica presenza all'interno di tessuti sani dove interviene nel metabolismo e nel ricambio energetico intracellulare.

Allo stato attuale delle conoscenze mediche, l'approccio alla patologia tumorale prevede l'utilizzo di protocolli terapeutici espletati somministrando sostanze ad azione antiblastica di diversissima natura (derivati della vinca, inibitori del fuso mitotico, anticorpi monoclonali di ultimissima generazione, antiangiogenetici, antimicrobici citostatici e così via) inoculati in genere in associazione (multichemioterapia) e/o combinati con agenti fisici anticancerosi (radiazioni, calore, laser ecc.); in ogni caso, l'azione viene esplicata in maniera non selettiva e tale condizione rappresenta fin dagli albori dell'oncologia il fattore limitante nelle strategie chemioterapiche messe in atto per fronteggiare la crescita afinalistica ed incontrollata delle neoplasie. La somministrazione di combinazioni di citostatici ed agenti fisici anticancerosi trova nella distruzione indifferenziata di tutte le strutture cellulari in attività mitotica la maggiore barriera ad un uso a pieno dosaggio che permetta il maggior indice possibile di riduzione volumetrica e

plastica delle masse tumorali. A tal proposito, una proteina non tossica per i tessuti organici e capace di esplicare il suo potere anticanceroso esclusivamente su precisi citotipi maligni come la rMnSod potrebbe ovviare almeno in linea potenziale e teorica ai succitati inconvenienti.

LA rMnSOD (1-7)



**Figura numero 2**

Rappresentazione schematica della Manganese Superossidodismutasi

La Manganese Superossidodismutasi ricombinante si caratterizza per una struttura molecolare stechiometrica in cui l'atomo di Manganese occupa una posizione centrale come fattore differenziale rispetto ad altri enzimi dello stesso gruppo.

Gli studi di farmacologia, effettuati prima della sperimentazione clinica della molecola sia "in vitro" su colture cellulari MCF-7 che "in vivo" su topini nudi tumore-indotti, hanno confermato che essa risulta citotossica solo per cellule cancerose sovraesprimenti recettori per estrogeni (Es+) e che la captazione del farmaco (dimostrata mediante marcatura con sostanze radio-emittenti) avviene anche in presenza di lesioni "in situ" (dimensioni inferiori a 3 mm) permettendo così diagnosi estremamente precoci (Mancini et al, 2007). Il meccanismo d'azione della proteina sembrerebbe riconducibile alla trasformazione dei radicali liberi, frutto del metabolismo cellulare, in perossido di idrogeno che in caso di carenza di enzimi come per esempio le catalasi che veicolano

l'eccesso di tale sostanza in sede extracellulare indurrebbe necrosi. Questa azione si esplicherebbe in massima parte sulle cellule tumorali, caratterizzate da intensa attività cellulare (e quindi notevole produzione di radicali liberi) e da scarso corredo enzimatico (sono quindi incapaci di portare all'esterno l' $\text{H}_2\text{O}_2$  in eccesso), mentre lascerebbe pressochè intatte le strutture normali (nelle quali peraltro le Sod sono normalmente presenti).

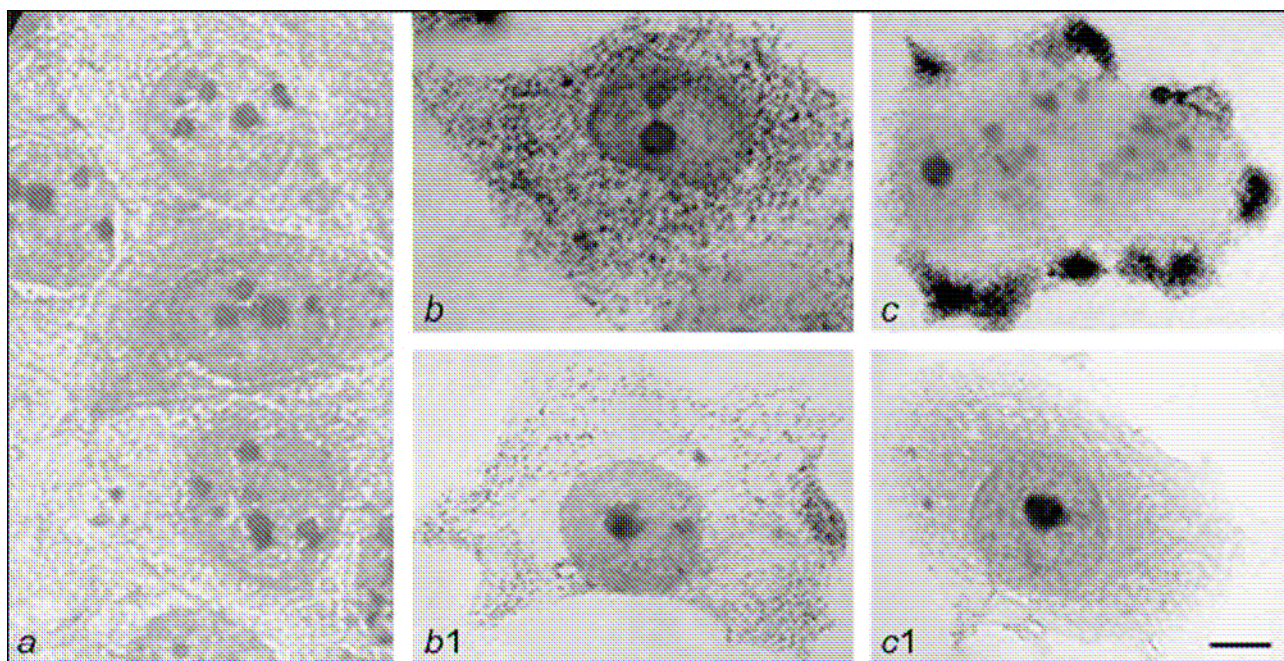


Figura numero 3 - Analisi immunoistochimica di cellule tumorali (MCF-7) trattate con rMnSod.

a- cellula tumorale non trattata; b- cellula trattata con rMnSod dopo un'ora; b1- cellula tumorale trattata con rMnSod dopo due ore; c- cellula tumorale trattata con rMnSod ed estadiolo; c1- cellula tumorale trattata solo con estradiolo.

Gli studi di biodistribuzione eseguiti sulla rMnSod prima della sua sperimentazione clinica in animali padronali affetti da carcinomi ed adenocarcinomi mammari spontanei,

effettuati inoculando la proteina in animali da laboratorio affetti da carcinomi mammari indotti metastatici al polmone e previa marcatura della stessa con iodio radioattivo per determinarne l'entità e la sede di captazione, hanno messo in luce la notevole specificità della sostanza nel concentrarsi esclusivamente nei tessuti neoplastici lasciando praticamente inalterati gli altri.

Nei test “in vitro” si è anche potuto dimostrare in maniera indiretta il ruolo centrale svolto dai recettori per estrogeni nell'assorbimento della proteina (De Las Mulas JM et al, 2005); due colture di MCF-7 sono infatti state poste in contatto con la rMnSod ed una è stata anche saturata con una quantità nota di estradiolo. In quest'ultima la captazione della molecola è risultata bassissima confermando l'ipotesi che il sito d'ingresso nelle cellule maligne sia rappresentato proprio da tali strutture e che di conseguenza la proteina stessa risulti efficace solo nelle forme Es<sup>+</sup> (il meccanismo d'azione preciso non è ancora stato ben chiarito). Tale ulteriore ipotesi è stata avvalorata mettendo in contatto la sostanza con colture cellulari sensibili (nello specifico sempre MCF-7) e ipoteticamente non sensibili (MRC-5): mentre nelle prime si verificava un notevole aumento della concentrazione intracitoplasmatica di perossido di idrogeno con conseguente necrosi, nelle seconde i livelli di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rimanevano pressochè inalterati.



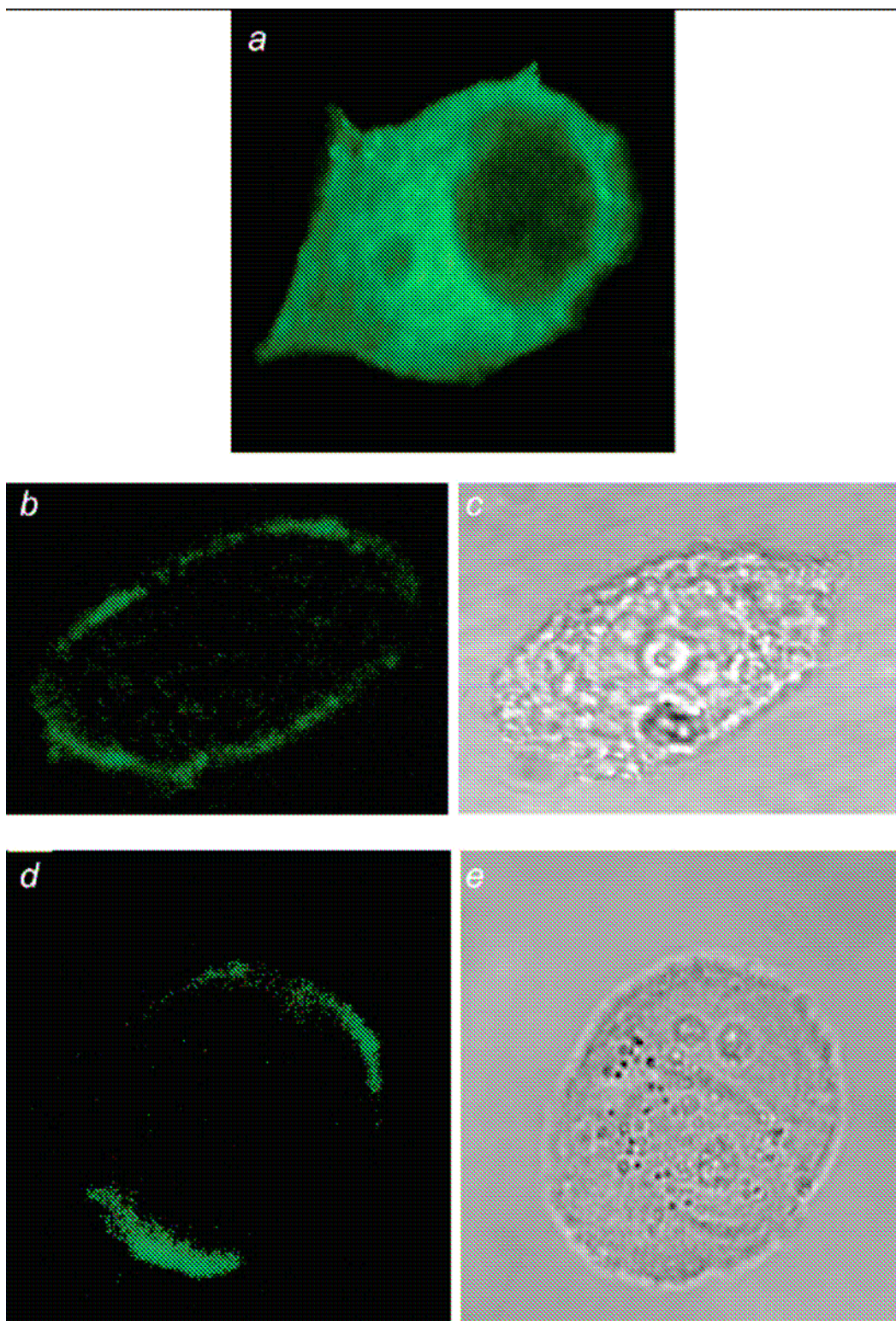


Figura 4 – Immagini ottenute al microscopio confocale che mostrano la distribuzione della rMnSod nelle cellule cancerose MCF-7 pre (a) e post trattamento (b) con estradiolo; nella figura (d) è

mostrata una cellula MCF-7 controllo. Nelle figure (c) ed (e) sono mostrate le immagini contrastografiche.

La biodistribuzione della molecola è stata valutata su topini nudi divisi in due gruppi di cui uno utilizzato come controllo formato da animali sani ed il secondo in cui i soggetti hanno ricevuto l'impianto intraperitoneale di colture di adenocarcinoma ovarico umano; entrambi i gruppi sono stati trattati con rMnSod (4 µg di proteina radiomarcata in peritoneo), soppressi 3 ore dopo l'inoculazione e dissezionati. Tutti gli organi sono stati posti in gamma-camera per determinare l'entità di emissione di radiofarmaco. I risultati, estremamente soddisfacenti, parlavano di una captazione della molecola nelle masse neoplastiche superiore di circa 4-5 volte rispetto agli organi sani confermando la notevole specificità della proteina per i tessuti tumorali.

La stadiazione di un tumore, così come il suo indice di assorbimento di una determinata proteina, possono essere messi in luce legando alla molecola stessa un radiofarmaco che funga da mezzo di contrasto e permetta di individuare la captazione della molecola e le eventuali lesioni metastatiche diffuse nell'organismo al momento della esecuzione di un esame scintigrafico o "PET" (So Won Oh et al, 2007).

#### SCOPO DEL LAVORO (1-8)

Scopo del presente lavoro è stato valutare l'efficacia clinica della Manganese SuperOssidoDismutasi estratta da coltura media di cellule pleiomorfe di liposarcoma umano ed ottenuta in forma ricombinante in *Escherichia coli* (rMnSod) isolata presso i laboratori di biologia molecolare dell' "Istituto per lo Studio e la Cura dei Tumori" fondazione "Pascale" di Napoli da una "equipe" facente capo al Dottor Aldo Mancini. Tale studio, eseguito nel periodo 2003-2008 come frutto della collaborazione tra

l'Istituto per lo studio e la cura dei tumori, fondazione “Pascale” di Napoli e la sezione di Ostetricia e Ginecologia della Facoltà di Medicina Veterinaria di Napoli e tuttora in fase di ampliamento, si è posto l'obiettivo di valutare il possibile utilizzo della rMnSod sia come marker tumorale per diagnosi precoci che come agente antineoplastico per tumori mammari canini Es+. In questo senso, l'uso della proteina è stato considerato anche come “*carrier*” per radiofarmaci e mezzi di contrasto per indagini diagnostiche e per sostanze beta-emittenti per trattamenti mirati “intralesionali” delle neoplasie. Lo studio si è dipanato su cagne di differente razza, peso ed età portate a visita presso l'ambulatorio di Ostetricia della Facoltà di Veterinaria di Napoli per la presenza di neoformazioni mammarie di aspetto, localizzazione ed istotipo diverso; il fulcro della ricerca è stato valutare attraverso acquisizioni di immagini tramite scintigrafia o PET-TAC la captazione della sostanza radiomarcata nelle sedi neoplastiche e la conseguente possibilità di utilizzare la stessa nella diagnostica e terapeutica tumorale. Attualmente la sperimentazione si sta concentrando sull'utilizzo della proteina chimicamente legata a citostatici come il cisplatino da veicolare direttamente all'interno dei tumori mammari mentre ancora in fase embrionale è l'idea di usare la rMnSod nei mezzi di contrasto ecografici negli screening di massa per diagnosi precoci. In tal senso, la casistica ancora troppo limitata ci ha impedito di portare dati in merito ma auspichiamo la loro pubblicazione in un futuro prossimo.



## Capitolo 2

### NEOPLASIE MAMMARIE NEL CANE (2-1)

L'incidenza delle neoplasie mammarie varia notevolmente in Medicina Veterinaria e senza dubbio tra le specie domestiche il cane mostra la più spiccata tendenza a manifestare tumori alle mammelle, con un'incidenza circa tre volte superiore alla donna; almeno il 50% di tutti i tumori maligni della cagna sono localizzati alle ghiandole mammarie, che in questa specie offrono caratteristiche sia anatomiche che endocrine del tutto particolari.

Le dieci mammelle della cagna (una inguinale, due addominali e due toraciche per ogni lato) sono delle ghiandole esocrine il cui parenchima presenta come unità fondamentale l'alveolo, rivestito da epitelio secernente che si continua in un dotto escretore costituito da epitelio semplice che tende a confluire con altri tubuli in quelle che sono le vie di escrezione fino alla cisterna del latte. Ogni alveolo ha intimi rapporti anatomici con fibrocellule muscolari lisce che intervengono nell'eiezione latte. Lo stroma è dato da fasci di tessuto connettivo che occupa gli spazi interalveolari e interdettali. In ambito ultrastrutturale sia le cellule secernenti che quelle di rivestimento espongono sulla membrana plasmatica diversi siti recettoriali tra cui ricordiamo quelli per estrogeni (probabilmente implicati nella galattorrea post-partum) che quelli per progesterone (che invece intervengono nei meccanismi di trofismo ghiandolare e galattopoiesi prolattina-indotta) (Nelson, 1974).

## EZIOLOGIA DELLA PATOLOGIA NEOPLASTICA (2-2)

Il cancro è un processo patologico complesso con un'eziologia multifattoriale ed il suo sviluppo è il risultato di un'azione spesso sincrona tra agenti fisici (come radiazioni ionizzanti), chimici (tutto il novero delle sostanze cosiddette cancerogene) e infettivi (virus portatori o attivatori di oncogeni); accanto a questi, un ruolo di prim'ordine è svolto da fattori endogeni includenti cause genetiche, immunitarie, ormonali. Tutti questi agenti, agendo direttamente o indirettamente su strutture geniche responsabili del controllo del “turn-over” cellulare, inducono modificazioni del DNA che sono alla base della moltiplicazione incontrollata ed afinalistica dei citotipi maligni (Todorova, 2006).

## TEORIA GENETICA (2-3)

Diverse sono le teorie proposte per spiegare la genetica della carcinogenesi; da molti viene avanzata la teoria secondo la quale le mutazioni geniche sarebbero alla base della trasformazione delle cellule somatiche agendo direttamente sul controllo dell'attività mitotica (Jefford, 2006); secondo altri autori (Zavadil, 2004) differenti cause agendo simultaneamente sono responsabili di differenziazione atipica di alcuni cloni cellulari caratterizzati dalla distruzione dei meccanismi di controllo operato dall'organismo. Infine, una delle prime ipotesi avanzate riguardava la presenza in tutte le cellule di geni normali, definiti protooncogeni, che sarebbero attivati da fattori esterni e indurrebbero la malattia neoplastica (Spandidos, 1985). In realtà, più che interessare un gene “in toto” spesso le anomalie riguardano solo una frazione dell'Acido Disossiribonucleico che va incontro ad mutazione a seguito di alterazioni spontanee, di agenti infettivi o dell'azione di fattori multipli implicati nell'eziopatogenesi tumorale (Loeb, 2000). A dire il vero, non sempre è sufficiente una singola mutazione genica per indurre la trasformazione

cellulare essendo infatti dimostrata l'esistenza di geni (i cosiddetti "soppressori") capaci di codificare proteine responsabili di "riparazioni" del materiale cromosomico alterato; tali strutture (tra cui ricordiamo il gene p-53) intervengono nell'indurre apoptosi delle cellule alterate ma se la mutazione genetica riguarda una delle loro sequenze aminoacidiche il risultato è una moltiplicazione incontrollata del clone interessato (Ghosh, 2005). Tale gene si è dimostrato responsabile della carcinogenesi mammaria tanto nell'uomo quanto nel cane (Wakui, 2001). Altri geni molto importanti sono i protooncogeni responsabili della sintesi del DNA, della crescita cellulare e della mitosi; tra essi un ruolo importante è rivestito dal p-185 dimostratosi implicato nel determinismo di tumori mammari canini a prognosi piuttosto sfavorevole (Schafer, 1998).

I fattori genetici implicano anche una ben distinta predisposizione di razza con elevata incidenza in Boxers, Golden Retrievers, Rottweilers, Boston Terriers, English Bulldogs, Cocker Spaniels (Cullen, 2002), mentre altre razze come Setter, Cocker e Terrier mostrano una spiccata tendenza a manifestare nello specifico neoplasie mammarie (Rodney, 2001).

#### VIRUS ONCOGENI (2-4)

Tra i fattori oncogeni esogeni ricordiamo anzitutto le cause infettive e in particolar modo quelle virali, comprendenti tanto DNA- quanto RNA-virus capaci di trasformare in senso neoplastico delle cellule infettate (Madewell, 1987). Nella fattispecie di cancro mammario sembrano maggiormente implicati i virus a DNA (Sourvinos, 2000), che hanno dimostrato di agire direttamente nell'attivazione dei protooncogeni. Ruolo di prim'ordine nella carcinogenesi è anche svolto dagli agenti chimici che attraverso

meccanismi d'azione sia diretti che indiretti interferiscono col metabolismo cellulare inducendo la perdita di controllo mitotico (Wild, 1996); molte sostanze chimiche, normalmente presenti negli alimenti o nell'ambiente (nitrati/nitriti, idrocarburi aromatici, bifenili ecc.) sono capaci di danneggiare il DNA e conseguentemente di trasformare in senso maligno le cellule (Ames, 1990).

#### AGENTI FISICI (2-5)

Non si possono poi sottovalutare gli agenti cancerogeni fisici come le radiazioni distinte in ionizzanti, che sembrano agire alterando in maniera diretta il DNA e sopprimendo il potere dell'organismo di controllare il "turn-over" cellulare, e ultraviolette che invece causano cambiamenti nelle catene aminoacidiche alla base delle mutazioni gnomiche (Guzman, 2003); in linea generale, tali fattori oncogeni (comprendenti tanto raggi X quanto raggi  $\gamma$ ) hanno un potenziale d'azione proporzionale alla dose e alla esposizione e inducono la sintesi di molecole altamente reattive come i radicali liberi che attraverso dispendio energetico sottraggono un elettrone all' $O_2$  con formazione di radicali anionici responsabili del danno cromosomico (Biaglow, 1981).

#### ANOMALIE CONGENITE ED IMMUNITARIE (2-6)

Esistono anche dei cosiddetti fattori endogeni che intervengono nel determinismo della patologia neoplastica e tra essi ricordiamo anzitutto i difetti genetici ereditari responsabili di tumori in animali giovani (Lloyd, 2005), ma anche tutte quelle condizioni che alterano i meccanismi della sorveglianza immunitaria, la capacità cioè dell'organismo di riconoscere cellule trasformate in senso cancerose e distruggerle. Tale caratteristica risulta deficitaria nei soggetti giovani o in quelli molto anziani o in pazienti che per patologie concomitanti mostrano riduzione della risposta immunitaria e che

manifesteranno un'elevata tendenza alla patologia neoplastica (Rosenthal, 1998).

## NEOPLASIE ORMONO-INDOTTE (2-7)

Nonostante l'eziologia precisa delle neoplasie mammarie sia ancora in gran parte sconosciuta e numerosi siano i fattori che da tempo vengono additati essere responsabili della patogenesi e dell'evoluzione del processo canceroso (Schneider, 1969), è ormai accertato dalla bibliografia internazionale il ruolo centrale svolto dalla stimolazione ormonale operata soprattutto da estrogeni e progesterone sul determinismo dell'iperplasia e della successiva trasformazione in senso canceroso del tessuto ghiandolare delle mammelle (Rodney, 2001). È dimostrata la possibilità delle cellule epiteliali degli alveoli mammari di produrre GH sotto induzione progestinica e tale capacità è enfatizzata nelle fasi di maggiore stimolazione con P4 come avviene in diestro. Il fatto che la produzione di somatomedina fosse associata con aree locali di iperplasia epiteliale lascia intuire un meccanismo autocrino o paracrino nella stimolazione tumorale (Van Garderen, 1997). D'altro canto, la produzione P4-indotta di GH in ambito mammario è stata ampiamente accertata con differenti metodiche sperimentali tra cui la stimolazione di cagne sterilizzate con progestinici esogeni o l'esecuzione di mastectomia totale per ridurre i livelli ormonali mammari (Selman, 1994). In studi precedenti era stata dimostrata la differente espressione dei siti di produzione "in loco" di fattore di crescita e la differente entità di stimolazione tra il tessuto normale e quello neoplastico (Fernig, 1991).

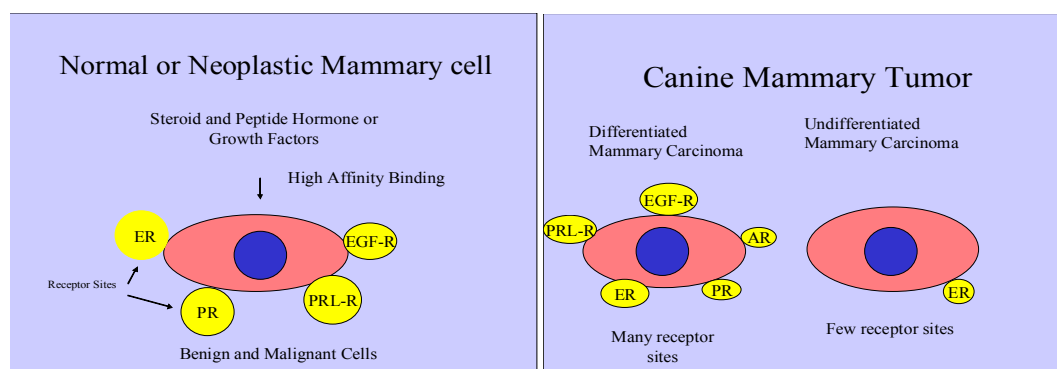
## RECETTORI ORMONALI (2-8)

Parallelamente, è ormai comprovata la presenza di siti recettoriali mammari capaci di

interagire con il progesterone endogeno o i progestinici esogeni (Jammes, 1991); in particolar modo, è stato visto che circa il 60% dei tumori mammari maligni espongono recettori per estrogeni, più del 30% recettori per i progestinici e circa il 20% recettori per androgeni. Il numero dei siti, ma anche e soprattutto la loro distribuzione riveste un ruolo fondamentale nella differenziazione tra tumori benigni e maligni e tra tumori poco e molto invasivi (Ruttemann, 1988). Che la stimolazione ormonale abbia una importanza non trascurabile nel cancro della ghiandola mammaria è comprovato da studi epidemiologici in cui il rischio è proporzionalmente più basso man mano che più precocemente avviene la sterilizzazione fino a giungere ad una percentuale quasi nulla negli individui neutralizzati ancora impuberi (Sorenmo, 2003).

In ogni caso, un ruolo fondamentale nella crescita “in vivo” di cellule cancerose mammarie è svolto dall’Ormone di rilascio delle gonadotropine (Lombardi, 1999) come confermato da un recente studio che utilizzava un agonista del GNRH che ha dimostrato di avere la capacità di bloccare “in vitro” la crescita di colture cellulari ottenute da neoplasie mammarie (Pagnini, 2002). D’altro canto, è ampiamente documentata anche la sovraespressione di estrogeno recettori (ER) in molte delle lesioni a carattere neoplastico della ghiandola mammaria (MacEwen, 1982); in questa ottica, è possibile distinguere due isoforme recettoriali distinte in ER $\alpha$  ed ER $\beta$  di cui la prima sembra essere presente in proporzioni pressappoco uguali tanto nelle neoplasie benigne che in quelle maligne, mentre la seconda eccede nelle forme invasive e a carattere misto da un punto di vista istologico (De Las Mulas, 2004). Allo stesso modo, esiste una netta differenza nell’espressione di ER $\alpha$  tra le forme carcinomatose a media invasività e quelle (come il carcinoma infiammatorio) caratterizzate da notevole aggressività cellulare che mostrano

una scarsissima espressione recettoriale probabilmente in virtù della marcata dedifferenziazione e immaturità dei cloni coinvolti (Llerra, 2006). In ogni caso, nella maggioranza dei tumori mammari canini si assiste ad una simultaneità di differenti siti recettoriali sovraespressi contemporaneamente ed in misura pressappoco uguale tra estrogeno-cettori, progestinico-cettori e androgeno-cettori (Elling, 2004). Sempre ben documentata è la presenza, in associazione coi recettori per estrogeni, di siti per il Fattore Epidermico di Crescita (EGFR) nelle forme a maggiore invasività. Esiste in ogni caso una sovraespressione recettoriale che è tanto minore quanto più alto è il grado di dedifferenziazione cellulare (Nerukar, 2006) come mostrato negli schemi di seguito esposti.



**Figura numero 5**

Rappresentazione schematica dell'espressione recettoriale in cellule carcinomatose mammarie

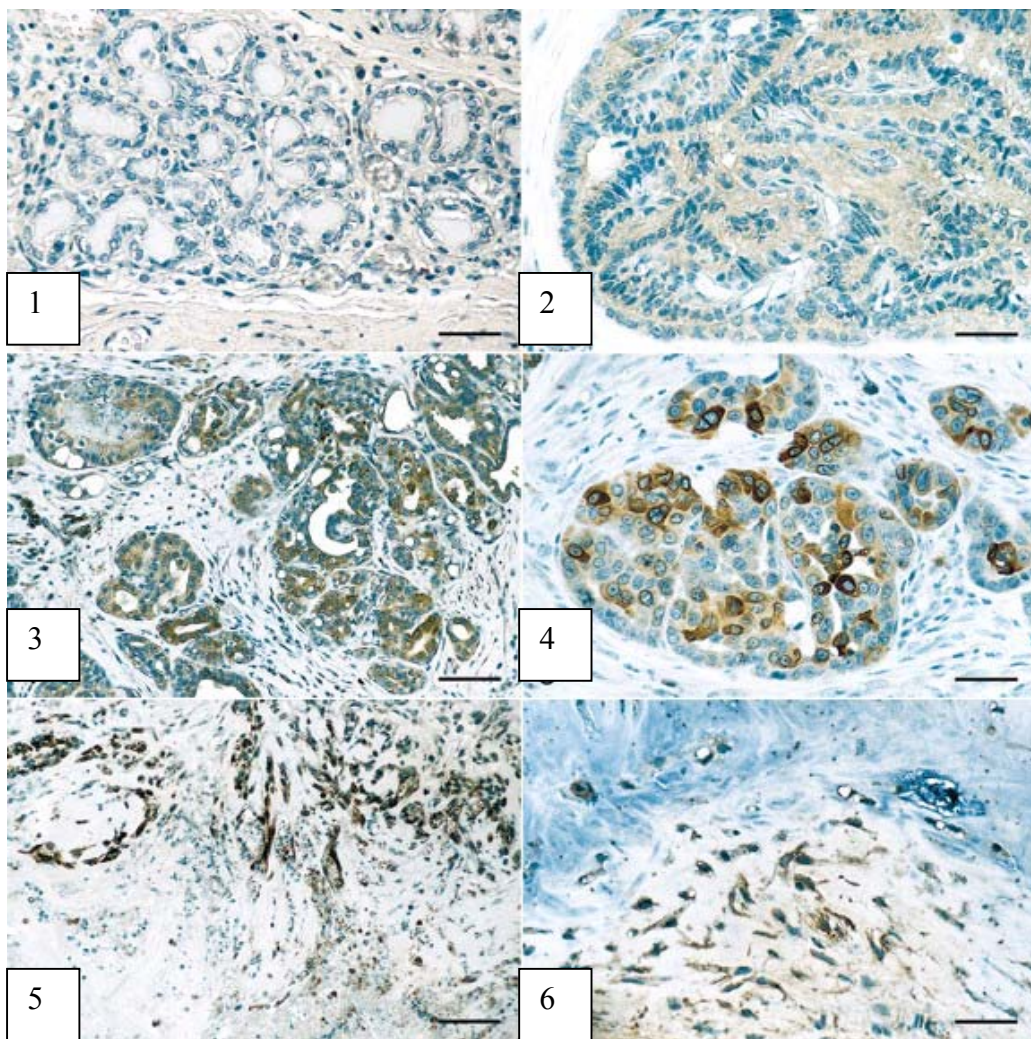
## ISTOLOGIA E CLASSIFICAZIONE (2-9)

Numerose sono le neoplasie che possono coinvolgere il tessuto mammario (klein, 1989), sia come localizzazione primaria che come sede metastatica secondaria (Rutteman, 2001); notevole polimorfismo è offerto anche dai caratteri di malignità ed invasività delle stesse (Sarli et al, 2002). Mentre nell'uomo è riconosciuta la tendenza delle neoplasie del seno a manifestare caratteri di benignità, nel cane a fronte di rare forme

benigne (di solito papillomi, lipomi, fibromi, leiomiomi), nella maggior parte dei casi i tumori mammari mostrano evidenti segni citopatologici ed eziopatogenetici di malignità (Hahn, 1992) tanto nelle forme di origine epiteliale (carcinomi ed adenocarcinomi, epiteliomi, mioepiteliomi) quanto in quelle mesenchimali (sarcomi, liposarcomi, leiomiosarcomi) o linfopoietiche (linfomi) (Misdorp, 2002, Dorè, 2003, Benjamin, 1999).

L'istologia delle neoformazioni mammarie canine è alquanto complessa essendo spesso contemporanea la presenza di due o più cloni di cellule atipiche. In un recente studio del 2003 (Ferreira, 2003) è stata proposta una classificazione che metteva in rapporto le linee cellulari ed i tessuti coinvolti con la nomenclatura anatomopatologica dei tumori alla mammella.





**Figura numero 6**

- 1- Cellule epiteliali mammarie normali ottenute da acini ghiandolari non alterati;
- 2- Adenoma mammario con cellule neoplastiche disposte con leggera reazione citoplasmatica;
- 3- Adenocarcinoma mammario, reazione cellulare moderata-lieve;
- 4- Adenocarcinoma mammario con reazione cellulare intensa;
- 5- Adenocarcinoma mammario con cellule fusiformi e aree di necrosi;
- 6- Adenocarcinoma mammario misto a mio-epitelioma

In linea di massima i tumori mammari canini possono inquadrarsi in quattro tipi fondamentali a seconda dei fattori prognostici (benigni e maligni) e del tessuto d'origine interessato dal processo morboso; ne risulta una situazione che possiamo convenzionalmente riassumere come in tabella di seguito mostrata:

**Table 1 : Histopathological diagnosis of 150 canine mammary tumors**

Type of tumor	Percentage
<b>Malignant tumors</b>	
Complex carcinoma	12.2
Simple carcinoma	12.8
Tubulopapillary carcinoma	24.3
Solid carcinoma	10.1
Anaplastic carcinoma	2.7
<b>Special types of carcinomas</b>	
Spindle cell carcinoma	1.4
Squamous cell carcinoma	0.7
<b>Sarcoma</b>	
Fibrosarcoma	1.4
Osteosarcoma	1.4
Carcinosarcoma	0.7
<b>Benign Tumors</b>	
Adenoma	0.7
Simple adenoma	2.1
Complex adenoma	13.5
Basaloid adenoma	0.7
Fibroadenoma	1.4
Low-cellularity fibroadenoma	0.7
High-cellularity fibroadenoma	2.1
Benign mixed tumor	10.8

**Tabella numero 1**

Incidenza di differenti tipi di tumore mammario diagnosticati in 150 cani

È evidente la differente percentuale di incidenza delle singole forme tumorali. Nonostante la predominanza di tipologie maligne, i tumori mammari canini raramente, a differenza di quanto avviene nel gatto, mostrano evidenti segni di aggressività (Page, 2001) ed invasività (intese come tendenza a bypassare la circoscrizione imposta dalla reazione infiammatoria dell'organismo e a condurre a prognosi infausta nel brevissimo periodo) (Philibert, 2003); in ordine statistico di incidenza, la localizzazione delle lesioni metastatiche avviene al polmone, ai linfonodi mediastinici, al rene, al fegato, alla milza, alle ossa (Funakoshi, 2000). Meno frequenti sono le lesioni nervose, enteriche, genitali,

surrenaliche (Tiemessen, 1989).

Caratteristica delle cellule carcinomatose mammarie, come confermato da studi di comprovata validità scientifica (Elling et al, 2004; Shao, Brown, 2004; Nieto et al, 2000;), è la tendenza a sovraesprimere recettori per estrogeni e progestinici ipotizzandosi un'azione trasformativa per i primi, proliferativa per gli altri. Questa ed altre condizioni rendono evidenti le similitudini con l'oncologia umana sia in termini eziopatogenetici (induzione ormono-attiva e neoangiogenesi) (Mol et al, 1995;), che evolutivi (metastasi polmonari e linfoascellari/mediastiniche) (Tiemessen, 1989; Pereira et al, 2003), stimolando ricerche parallele uomo/cane di protocolli farmacologici utilizzabili tanto nella diagnostica quanto nella terapia (Cadieu, Ostander, 2007).

### Capitolo 3

#### MATERIALI E METODI (3-1)

La ricerca è stata condotta su dodici cagne di età compresa tra 6 e 14 anni, appartenenti a differenti razze e di peso compreso tra 4 e 30 kg, tutte presentate a visita presso l'ambulatorio della sezione ostetrico-ginecologica del Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie della Facoltà di Napoli per la presenza di neoformazioni mammarie di dimensioni e localizzazione variabili.



**Figura numero 7**  
Tumore mammario in una cagna



**Figura numero 8**  
Tumore mammario in una cagna

Ciascuna cagna è stata sottoposta ad esame clinico completo con particolare riferimento alle ghiandole mammarie e “screening” ematologico, comprendente esame emocromocitometrico completo con formula, profilo ematochimico completo con determinazione anche di LDH e isoenzimi, Fosfatasi Alcalina, Calcemia; per l’inquadramento diagnostico, ogni soggetto è stato sottoposto ad agoaspirato delle lesioni mammarie (Ferreira et al, 2003), indagine ultrasonografica transaddominale con sonde lineari da 7,5 mHz (Kaser-Hotz, 2005), valutazioni X-grafiche del torace in tripla proiezione (latero-laterale destra e sinistra, ventro-dorsale) (McCulloch, 2006).

Per uniformare gli esperimenti alla fase anaestrale e di conseguenza ridurre al minimo l'interazione coi siti recettoriali della proteina in esame degli estrogeni endogeni, i soggetti non sterilizzati aventi ovaie funzionalmente attive sono stati sottoposti ad indagine colpocitologica con prelievo vaginale di tampone non sterile, rotolamento su vetrino, colorazione con Hema-Color e lettura con microscopio ottico a 100x (Marti JA, 2002) e profilo ormonale attraverso la determinazione del Progesterone e dell'Estradiolo ematici mediante test immunoenzimatico per competizione associato a rilevazione in fluorescenza (ELFA).

Nei pazienti in cui lo “staging” diagnostico routinario ha messo in luce il sospetto di lesioni secondarie in sede diversa da quella mammaria (Inoue, 1999) per il quale è stato richiesto un approfondimento cito-istologico delle stesse tramite punture esplorative, si è proceduto a biopsia ecoguidata delle summenzionate formazioni previo profilo coagulativo e sedazione (*Medetomidina* 10 µg/kg im, “Domitor, 1mg/1ml”, Ketamina Hcl 1 mg/kg im, “Ketavet 100, 100mg/1ml”).

## CASI CLINICI (3-2)

Nella tabella di seguito mostrata vengono brevemente riassunti i pazienti arruolati per questo studio.

<b>Razza</b>	<b>Peso</b>	<b>Età</b>	<b>Mammelle interessate</b>	<b>Aspetto delle lesioni</b>
Meticcio	20 kg	11 anni	Intera catena destra	Noduli di dimensioni variabili
Pastore tedesco	25 kg	12 anni	Addominale craniale sinistra	Neoformazione voluminosa ben circoscritta
Boxer	25 kg	10 anni	Inguinale destra	Nodulo di medie dimensioni
York shire	5 kg	10 anni	Toracica caudale destra	Piastrone ulcerato
York shire	4 kg	9 anni	Intera catena sinistra	Noduli disseminati
Pit bull	30 kg	10 anni	Inguinale sinistra	Piastrone ulcerato
Barboncino	3 kg	11 anni	Addominale craniale destra	Nodulo a carattere racimoso
Bolognese	4 kg	12 anni	Inguinale sinistra	Nodulo bozzellato
Meticcio	15 kg	14 anni	Toracica craniale destra	Neoformazione voluminosa
Bretone	10 kg	6 anni	Toracica caudale destra	Nodulo circoscritto
Meticcio	8 kg	13 anni	Toracica craniale sinistra	Piastrone ulcerato
Volpino	4 kg	12 anni	Toracica caudale sinistra	Nodulo di medie dimensioni

**Tabella numero 2**  
Casi clinici

### FASE DI SPERIMENTAZIONE (3-3)

L'uso della proteina e le metodiche diagnostiche messe in atto per valutarne l'efficacia si sono dipanate in due periodi successivi e con modalità e finalità differenti.

Nella prima fase di sperimentazione (periodo Settembre 2005 – Dicembre 2006), i soggetti presi in esame (sei) sono stati sottoposti a valutazioni scintigrafiche (Schellingerhout, 2002) eseguite con apparecchiature di Medicina Nucleare presso l'Istituto per lo Studio e la Cura dei Tumori Fondazione “Pascale” di Napoli. L'acquisizione delle immagini è avvenuta a 3 e 24 ore dopo inoculazione endovenosa di 30 µg di rMnSod marcata con 500 µCi di Iodio I-<sup>131</sup> nella vena cefalica per valutare tanto l'entità quanto la sede di captazione della proteina.

I pazienti sono stati sedati con inoculazione intramuscolare di *Medetomidina* (Domitor, Pfizer, 1mg/1ml, 10 µg/kg) e posti in decubito laterale destro sul lettino dell'apparecchio. Alla fine dell'esperimento (la durata media dei test è stata di circa 30 minuti) i soggetti sono stati antagonizzati con *Atipamezolo* (Antisedan, Pfizer, 1mg/1ml, 10 µg/kg im). Successivamente si è proceduto a valutazioni terapeutiche e farmacodinamiche della rMnSod ed i pazienti in esame sono stati sottoposti a trattamento farmacologico giornaliero con 1 mg/die di proteina tal quale inoculata per via endovenosa per dieci giorni, sottocutanea per i dieci giorni successivi e intralesionale nell'ultima decade. A scadenza settimanale i soggetti venivano sottoposti a “screening” ematologici completi comprendenti esame emocromocitometrico con formula leucocitaria, profilo biochimico (GOT, GPT, GLU, BUN, CREA), protidogramma con elettroforesi, “staging” diagnostici per immagini comprendenti anche esami color doppler per la valutazione della vascolarizzazione neoplastica, misurazione delle masse tumorali.

Il secondo periodo di studio si è articolato nel biennio Gennaio 2007 – Agosto 2008 ed ha compreso sei cagne sottoposte ad indagine PET-TAC presso il reparto di Medicina Nucleare dell'Istituto per lo Studio e la Cura dei Tumori Fondazione “Pascale” di Napoli (Herschman, 2003). L'acquisizione delle immagini è avvenuta attraverso un tomografo PET-TAC Siemens Ecat 2D con ricostruzione nei piani ortogonali ed un numero di “bed-step” sufficiente a ricoprire l'intera superficie corporea del paziente (in genere sono risultati sufficienti 3 “lettini” per animali di peso inferiore a 5 kg, 4 per soggetti fino a 20 kg, 5 per i pazienti più grandi).

In questo caso le immagini sono state acquisite in una sola ricostruzione ottenuta 3 ore dopo inoculazione endovenosa di 30 µg di rMnSod marcata con 500 µCi di Gallio <sup>68</sup>Ga.

Anche in questi casi i test sono stati effettuati previa sedazione dei pazienti (10 µg/kg im di *Medetomidina*, “Domitor, 1mg/1ml”) che venivano successivamente posti in decubito laterale destro; alla fine dell'esperimento i soggetti venivano antagonizzati con *Atipamezolo* (10 µg/kg im, “Antisedan, 1mg/1ml”).

I soggetti inseriti in questo secondo gruppo, per i quali non è stato previsto l'utilizzo terapeutico della proteina, una volta effettuati i test e completato lo “staging” diagnostico, sono stati sottoposti a chirurgia radicale mediante intervento di mastectomia totale monolaterale nei casi in cui le lesioni tumorali erano localizzate in una sola catena mammaria, bilaterale nelle altre evenienze (Novosad, 2003). In entrambe le circostanze, si è proceduto a premedicazione sottocutanea con Atropina solfato (0,025 mg/kg), sedazione intramuscolare con miscela di Tramadolo (“Contramal”, 50mg/1ml, 3mg/kg), Medetomidina (“Domitor”, 1mg/1ml, 15 µg/kg), Ketamina cloridrato (“Ketavet 100”,



100mg/1ml, 1mg/kg), induzione endovenosa con Propofolo (“Rapinovel”, 10mg/1ml, 4mg/kg) e mantenimento con miscela di Ossigeno e Isoflurano al 2% (Sarrau, 2007).

Successivamente le masse asportate sono state trasferite senza liquidi di conservazione presso la sezione di Anatomia Patologica della Facoltà di Medicina Veterinaria di Napoli e sottoposte ad indagini istologiche, immunoistochimiche e biomolecolari.

In un paziente in cui sono state evidenziate lesioni infiltrative alla milza in contemporanea all'intervento di mastectomia è stata eseguita una splenectomia (Hoekstra, 1988) per poi trasferire l'organo escisso presso il reparto di anatomia patologica della facoltà dove è stato sottoposto ad indagini istologiche ed immunoistochimiche.

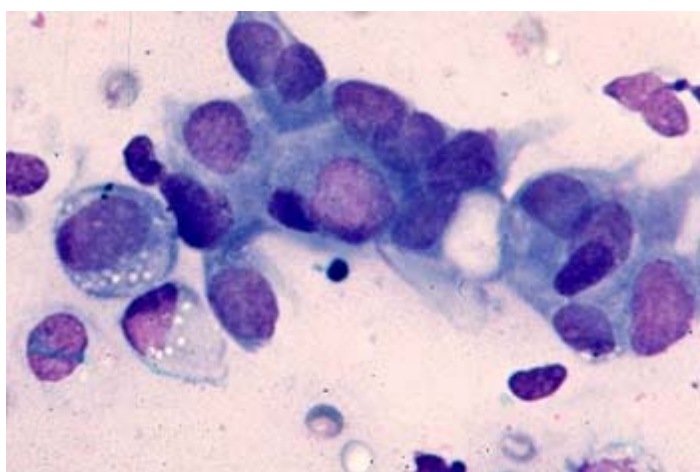
## Capitolo 4

### RISULTATI E DISCUSSIONE (4-1)

I soggetti selezionati per questo studio hanno tutti soddisfatto le caratteristiche prescelte; ciascuno dei pazienti all'esame clinico ha mostrato condizioni generali da buone ad ottimali per l'esecuzione della ricerca ed anche i profili biochimici e emocromocitometrici non sono risultati discordanti rispetto ai “range” di normalità.

### ESAMI DIAGNOSTICI (4-2)

La valutazione citologica degli aspirati mammari, oltre a confermare la natura neoplastica delle lesioni ha reso possibile la selezione delle forme tumorali ritenute sovraesprimenti Estrogeno-cettori (forme Es+); in particolar modo, per cinque pazienti è stata emessa diagnosi di carcinoma (proliferazione monoclonale caratterizzata da anisocitosi e anisocariasi di cellule immature di origine esclusivamente epiteliale), mentre per i restanti sette soggetti si è trattato di adenocarcinomi (in tre casi forme duttali, in due papillare-cistico, negli ultimi due forme miste a mioepitelioma).



**Figura numero 9**

Esame microscopico ottenuto da  
agoaspirato mammario

## STAGING DIAGNOSTICO (4-3)

Lo “staging” diagnostico di base ha messo in luce in due casi lesioni proliferative di presunta origine metastatica in ambito polmonare, in altri due casi infiltrazioni proliferative in sede epatica poi cito-istologicamente confermate come lesioni secondarie ai tumori mammari, in un altro caso un nodulo alla milza che poi all'indagine anatomopatologica (previa splenectomia) è risultato di natura cancerosa e metastatica; in tutti gli altri pazienti non si sono rivelate diffusioni sistemiche del processo morboso. Nella tabella numero 3 di seguito elencata vengono brevemente riassunti i risultati dell'inquadramento diagnostico. Per ogni caso clinico è stato indicato un riassunto del segnalamento del soggetto, il tipo e la localizzazione della neoplasia e le eventuali lesioni metastatiche con la metodica utilizzata per metterle in evidenza.

<b>Paziente</b>	<b>Neoplasia</b>	<b>Sede</b>	<b>Lesioni secondarie</b>	<b>Metodica</b>
Meticcio 20 kg, 11 anni	Carcinoma T3	Catena mammaria destra	Infiltrazioni epatiche	Ecografia
Pastore tedesco, 25 kg, 12 anni	Carcinoma T3	Addominale sinistra	Noduli polmonari	Radiografia
Boxer, 25 kg, 10 anni	Adenocarcinoma misto	Inguinale destra	Non evidenti	
York shire, 5 kg, 10 anni	Carcinoma indifferenziato	Toracica destra	Non evidenti	
York shire, 4 kg, 9 anni	Carcinoma infiammatorio	Catena mammaria sinistra	Infiltrazioni polmonari	Radiografia
Pit bull, 30 kg, 10 anni	Adenocarcinoma T2	Inguinale sinistra	Non evidenti	
Barboncino 3 kg, 11 anni	Carcinoma T2	Addominale craniale destra	Nodulo splenico	Ecografia
Bolognese 4 kg, 12 anni	Carcinoma T1	Inguinale sinistra	Non evidenti	
Meticcio 15 kg, 14 anni	Carcinoma anaplastico	Toracica craniale destra	Infiltrazioni epatiche	Ecografia
Bretona 10 kg, 6 anni	Carcinoma duttale	Toracica caudale destra	Non evidenti	
Meticcio 8 kg, 13 anni	Adenocarcinoma T3	Toracica craniale sinistra	Non evidenti	
Volpino 4 kg, 12 anni	Carcinoma anaplastico	Toracica caudale sinistra	Non evidenti	

### **Tabella numero 3**

Risultati delle indagini di diagnosi e stadiazioni delle neoplasie mammarie

## **RISULTATI ESPERIMENTI (4-4)**

Tutti gli esperimenti hanno permesso di mettere in risalto la concentrazione della sostanza nei siti tumorali e nelle lesioni metastatiche.

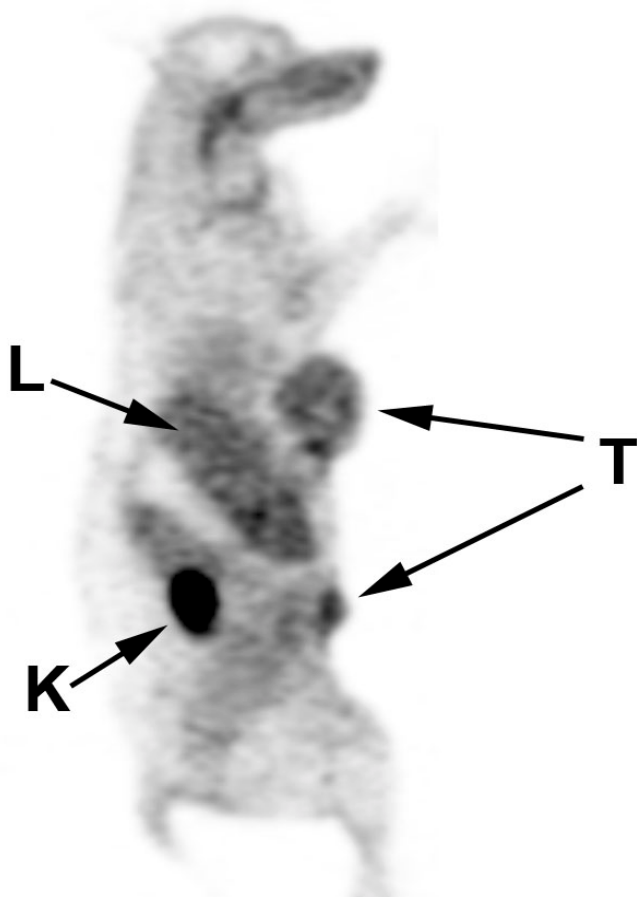


Figura numero 10

Risultato di una PET-TAC con rMnSod marcata con Gallio radioattivo

E' evidente la captazione mammaria (T) ed epatica (L), oltre alla filtrazione in sede renale (K)

Il soggetto in esame presentava una diffusa infiltrazione epatica da lesioni neoplastiche secondarie ai tumori mammari

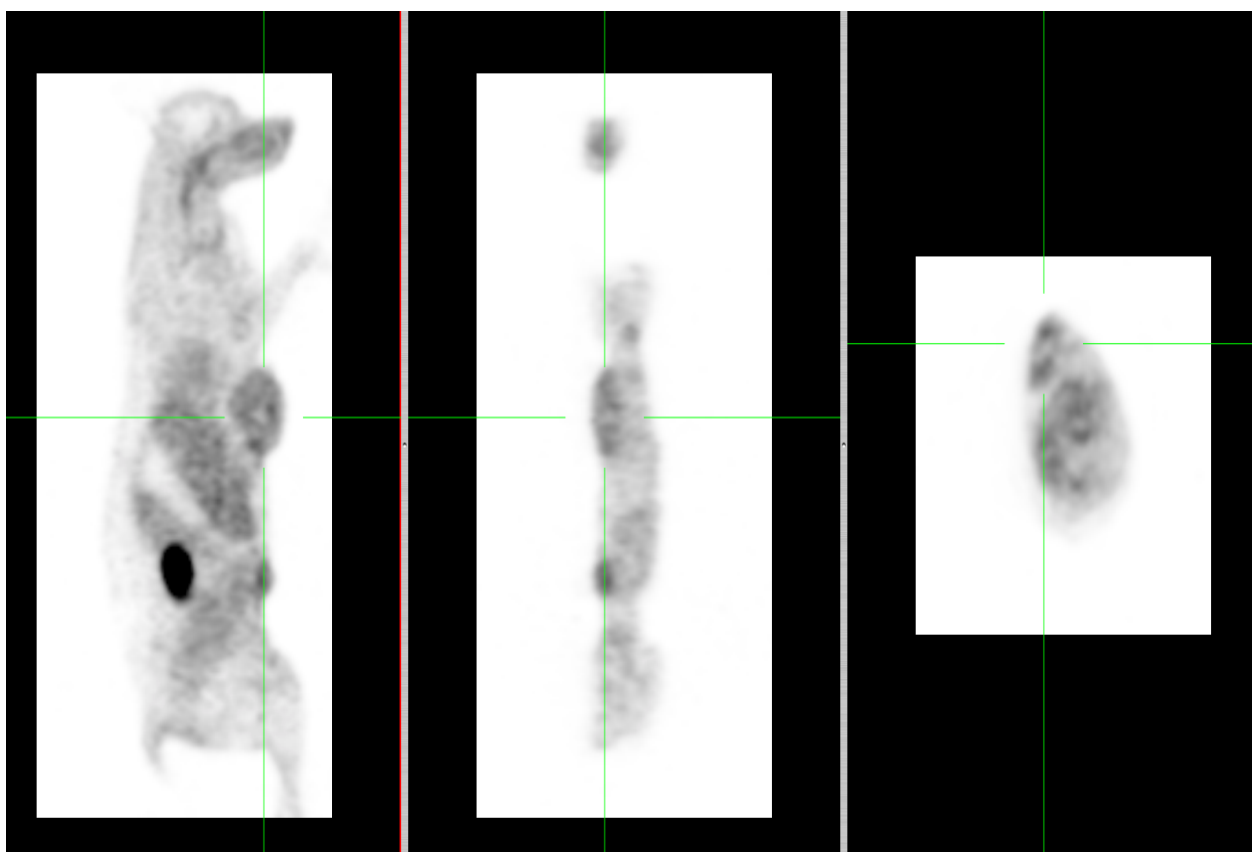


Figura numero 11

Particolari della catena mammaria del soggetto dell'immagine precedente in cui viene mostrata la captazione nei diversi noduli cancerosa della catena mammaria. Nella terza scansione un singolo tumore con le concamerazioni frutto dei differenti siti di deposito della proteina

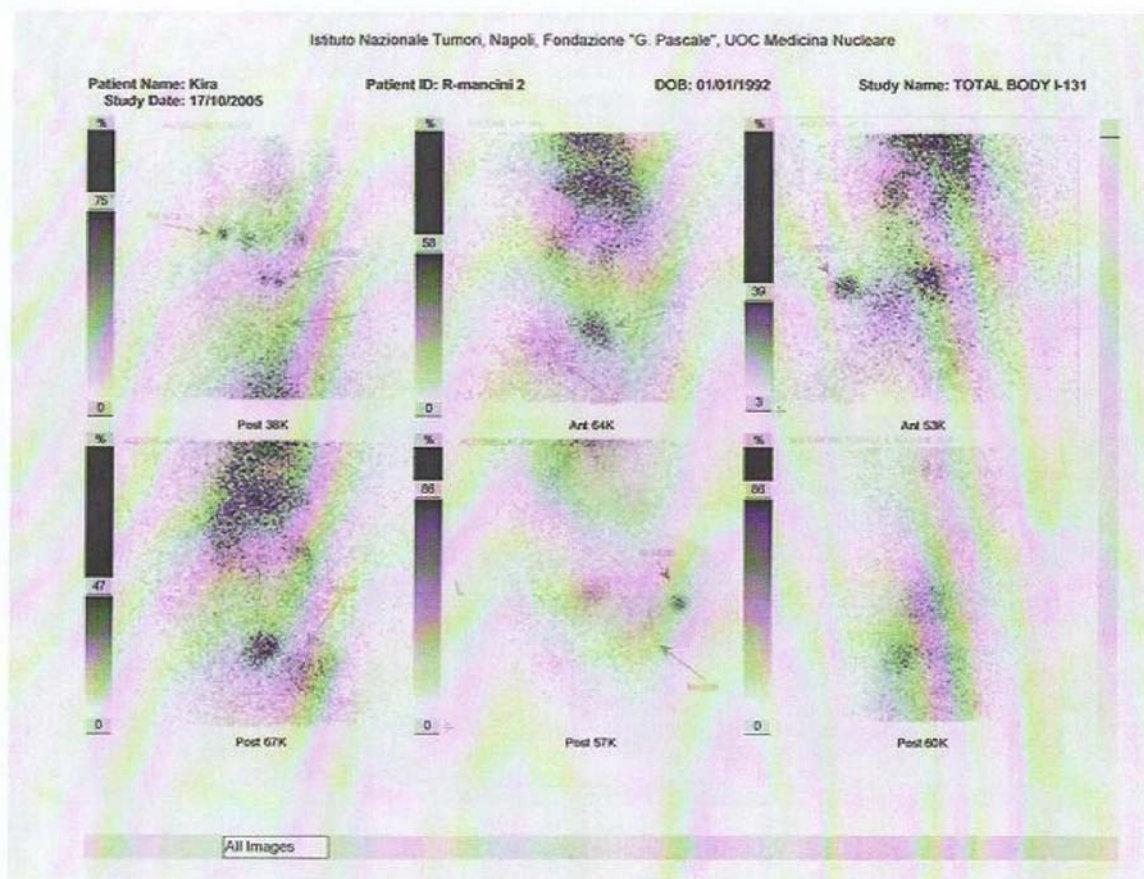


Figura numero 12

Particolari che mettono in evidenza la concentrazione della proteina nelle sedi neoplastiche. Anche in questo caso l'emissione dalle neoformazione è molto marcata.

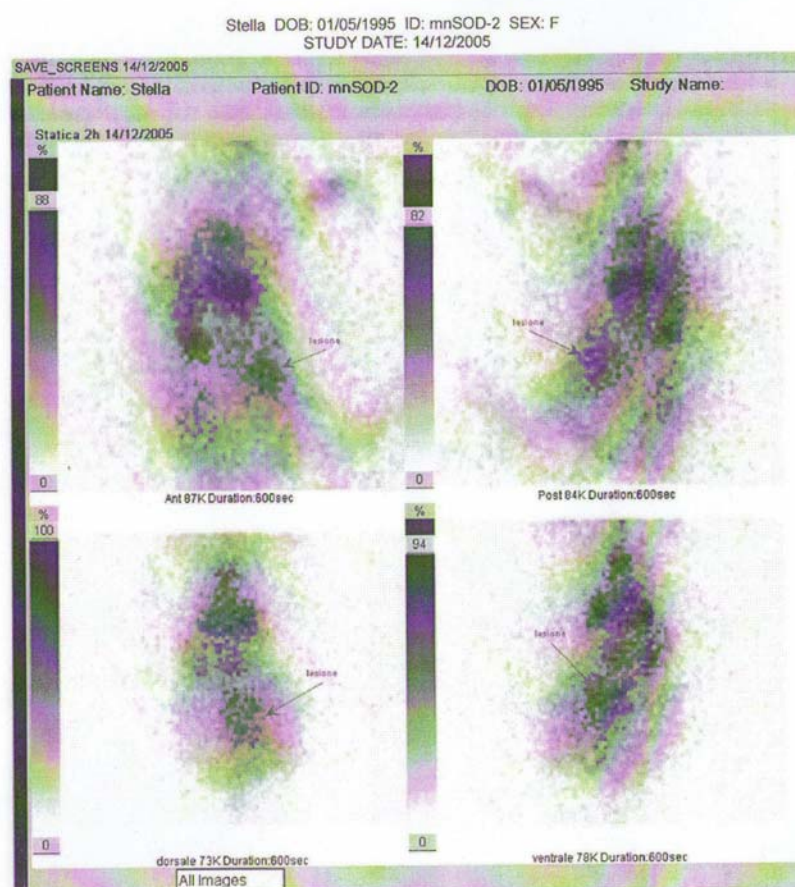


Figura numero 13

Un'altra scansione PET-TAC che mette in evidenza la captazione della proteina marcata in ambito mammario. Il tumore alla ghiandola addominale caudale è ben evidente per la concentrazione di radiofarmaco



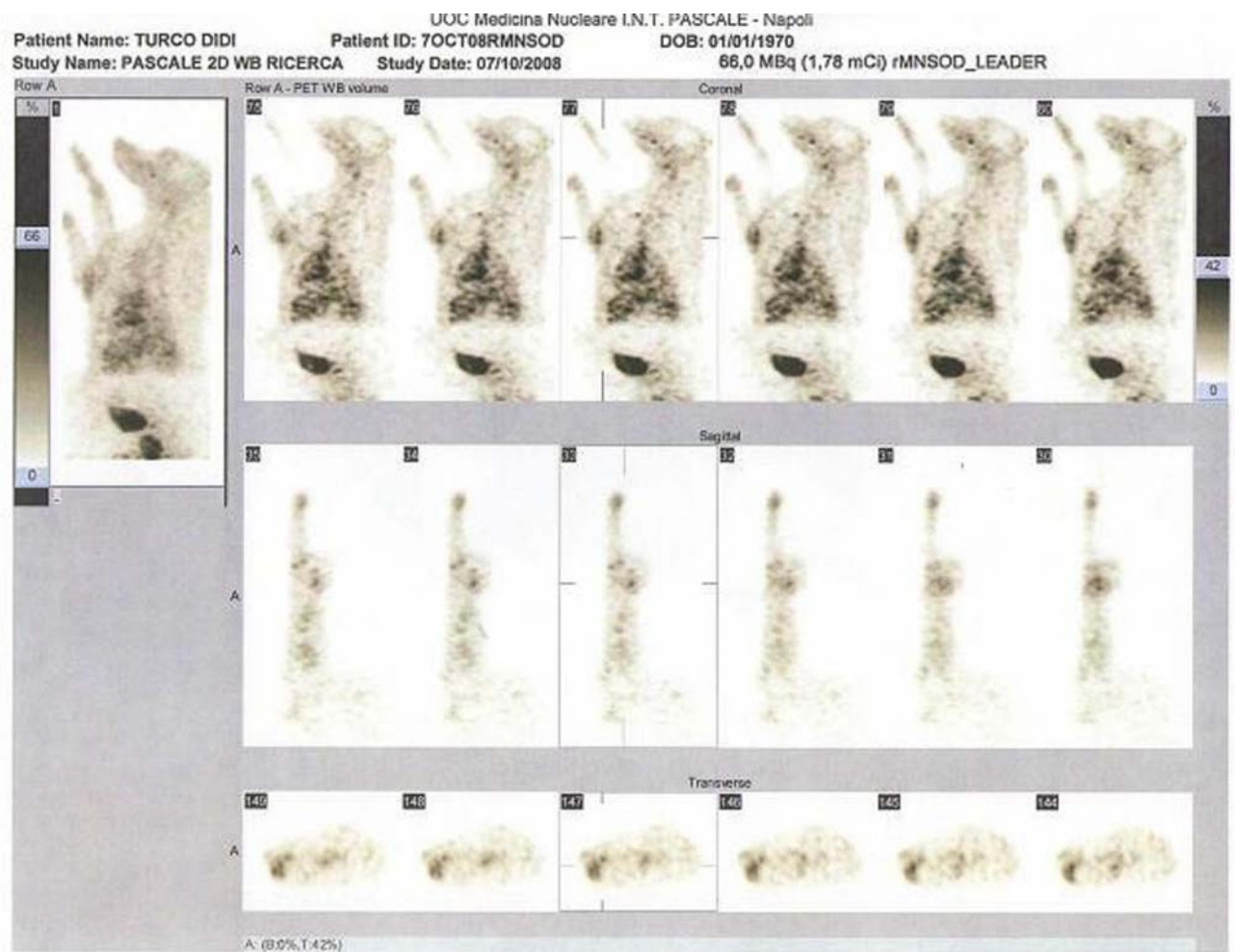


Figura numero 14

In queste scansioni vengono mostrate in alto il “total-body” del soggetto che mette in evidenza la captazione a livello della neoplasia localizzata alla mammella toracica craniale, al centro il particolare dell’intera catena mammaria col focolaio tumorale ben in luce e in basso le concamerazioni coinvolgenti il singolo tumore

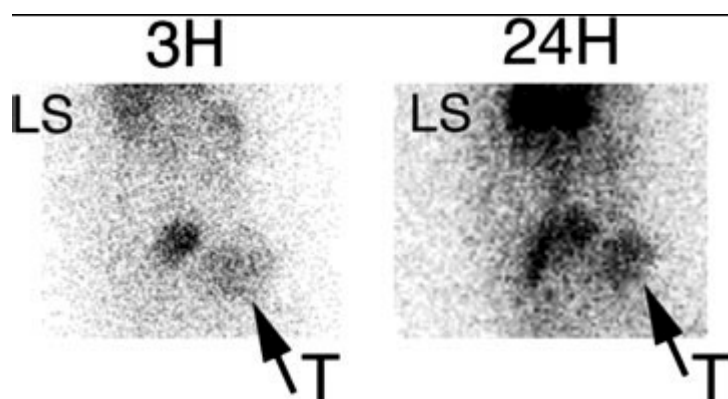


Figura numero 15

Acquisizioni scintigrafiche ottenute 3 e 24 ore dopo inoculazione endovenosa di rMnSod radiomarcata con Iodio 131. E' ben evidente la lesione tumorale (T)

In entrambi i gruppi, le immagini ottenute hanno mostrato l'entità di captazione della proteina radiomarcata; nelle valutazioni scintigrafiche eseguite 3 ore dopo la somministrazione del farmaco mettevano fortemente in risalto le masse tumorali in cui si concentrava la rMnSod radiomarcata. In un soggetto con forte sospetto di metastasi polmonare è stata messa in evidenza una formazione rotondeggiante nell'emittoce destro a forte radio-emissione.

Dato il basso peso molecolare della proteina, l'unico inconveniente delle prime scansioni

scintigrafiche è stata la filtrazione glomerulare con conseguente accumulo in vescica di sostanza, mentre scarsa è risultata la captazione a livello degli altri organi addominali (stomaco, intestino, fegato).

#### RISULTATI PRIMO PERIODO SPERIMENTALE (4-5)

La concentrazione della rMnSod nelle masse tumorali sia mammarie che metastatiche (laddove presenti) si è dimostrata elevata anche nelle immagini di Medicina Nucleare ottenute 24 ore dopo l'inoculazione endovenosa. In questo caso è fortemente diminuita l'emissione di radioisotopi dalla sede vescicale e ciò lascia intuire che l'escrezione urinaria del farmaco avviene in massima parte nelle primissime ore dopo la somministrazione (almeno per quanto riguarda la via endovenosa).

Come accennato, tutti i pazienti di questo gruppo sono stati successivamente sottoposti ad un protocollo terapeutico sperimentale con somministrazione giornaliera di 1 mg di proteina tal quale secondo un piano che ha previsto infusione endovenosa per dieci giorni, sottocutanea per altri dieci giorni e intralesionale (per via ecoguidata) nell'ultima decade. Durante questo periodo i soggetti sono stati monitorati a scadenza settimanale sia per quanto riguardava le condizioni fisiche generali, che sotto l'aspetto meramente oncologico mediante misurazioni e valutazioni eco-color-doppler delle masse tumorali mammarie.

In nessuno dei pazienti trattati si sono verificati effetti collaterali o comunque reazioni avverse; dal punto di vista clinico non si è registrata alcuna alterazione riferibile in sede anamnestica né variazioni delle grandi funzioni organiche, così come le determinazioni ematologiche riguardanti l'esame emocromocitometrico ed il profilo biochimico non hanno messo in risalto anomalie di sorta. La risposta alla terapia delle masse mammarie

è stata invece chiara e soddisfacente. Ciascuna neoplasia come detto è stata sottoposta a scadenza settimanale a misurazioni dei differenti diametri che in tutti i casi hanno mostrato progressiva riduzione con una velocità media di circa 4 mm a settimana. Attraverso l'uso del color-doppler, l'ecografia delle lesioni ha permesso di evidenziare la dinamica della citotossicità della rMnSod con formazione di multipli focolai necrotici tendenti gradualmente alla confluenza; ciò si è associato anche ad ulcerazione superficiale dei tumori con evidenti segni di necrosi colliquativa nell'ambito del tessuto neoformato, che ha indotto i clinici a sottoporre tutti i pazienti alla fine del trattamento a pulizia chirurgica mediante mastectomia radicale.

Limiti strumentali hanno impedito in corso di trattamento il monitoraggio delle presunte metastasi, mentre la loro evoluzione successiva è stata valutata attraverso routinarie metodiche per immagini come radiografie in tripla proiezione del torace ed in alcuni casi esame TAC. In tal senso, il “follow up” ha dato esiti contrastanti; mentre in un soggetto infatti si è registrata una parziale riduzione volumetrica della lesione polmonare che è successivamente rimasta quiescente ed il paziente gode a tutt'oggi di ottima di salute, negli altri casi (una presunta metastasi polmonare e due cagne con infiltrazioni epatiche) dopo un periodo iniziale di risposta positiva si è verificata (in media un mese circa dopo l'interruzione del trattamento) ripresa di crescita con decadimento delle condizioni generali. Tutti i pazienti di questo gruppo sono stati sottoposti a controllo scintigrafico ad un anno di distanza seguendo le stesse metodiche precedentemente riportate e tale valutazione in “Follow-up” ha messo in luce, nei soggetti che hanno risposto in maniera ottimale al trattamento, una riduzione di radioemittenza nelle sedi metastatiche.

## RISULTATI SECONDO PERIODO SPERIMENTALE (4-6)

Risposte molto simili in linea di massa si sono avute nei pazienti per i quali le valutazioni di biodistribuzione della proteina sono state effettuate mediante indagini PET-TAC con una sola acquisizione a 3 ore di distanza dalla somministrazione; in questi casi la concentrazione di gallio radioattivo legato a rMnSod comportava una radioemissione dai siti neoplastici Es+ mammari e secondari che risultava circa quattro volte superiore a quella che veniva emessa dai tessuti sani. Inoltre, la tomografia ad emissione di positroni permetteva, presumibilmente a seconda della distribuzione dei recettori per estrogeni, di scansionare le differenti masse tumorali e nell'ambito di quelle aventi dimensioni maggiori, sedi con differente entità di accumulo della sostanza.

Un paziente con imponente infiltrazione epatica e forte captazione della radioproteina in questa sede ha subito, poche settimane dopo l'esperimento, un rapido decadimento delle condizioni generali e di concerto col proprietario si è deciso per l'eutanasia. Questa è stata effettuata secondo i dettami legislativi e deontologici previa anestesia del soggetto e successiva infusione endovenosa di un farmaco appropriato capace di indurre arresto cardiorespiratorio ("Tanax"). Una volta accertato il decesso, la cagna è stata posta su tavolo da sezionamento per l'esecuzione degli esami autoptici ed i prelievi di tessuti suscettibili di approfondimenti diagnostici. La necropsia ed in particolar modo le indagini immunoistochimiche effettuate sul fegato del soggetto, hanno chiarito la natura neoplastica e metastatica (da carcinoma mammario T2) dell'infarcimento confermando da un lato gli esiti delle biopsie ecoguidate effettuate con l'animale in vita, dall'altro l'ulteriore tropismo della rMnSod per le lesioni sovraesprimenti estrogeno-cettori. Inoltre, la necropsia del paziente ha permesso di valutare la presenza di estese aree di

necrosi in sede epatica, presumibilmente riferibili all'azione citotossica del farmaco.

#### DISCUSSIONE (4-7)

Se la prima caratteristica richiesta ad un farmaco citostatico è il tropismo per le lesioni neoplastiche, possiamo senza dubbio affermare che i risultati appena esposti riguardanti l'utilizzo della rMnSod rappresentano un punto di partenza di notevole interesse per l'approfondimento di ricerche riguardo l'azione anticancerosa della proteina, che di per sé già potrebbe rappresentare una condizione soddisfacente; tuttavia è di estremo stimolo l'uso della sostanza non solo come marcatore tumorale precoce, ma anche come veicolo per portare direttamente all'interno delle lesioni (bypassando quindi gli organi sani) sostanze betaemittenti in un'ottica di radioterapia mirata con ridottissimi effetti collaterali per i pazienti.

Nello specifico, è senza dubbio suggestivo di approfondimenti lo studio riguardante le modalità di captazione della proteina anche nei casi di ridotta espressione recettoriale; rifacendoci infatti a recenti studi di biologia molecolare (Pena et al, 2003) alcune forme tumorali di elevata aggressività biologica e di spiccata dedifferenziazione cellulare dovrebbero risultare solo in minima parte Es<sup>+</sup> e ciò potrebbe limitare l'utilizzo della rMnSod in questi pazienti.

La Manganese Superossidodismutasi ottenuta in forma ricombinante è un'isoforma di un enzima normalmente presente nei tessuti organici e che non comporta alcuna ingiuria agli organi sani; anche i prodotti della sua attività (molecole di perossido di idrogeno) vengono rapidamente allontanati dalle cellule normali grazie al corredo catalitico. Cosa ben diversa rappresenta per le cellule cancerose sovraesprimenti recettori per estrogeni per le quali la somministrazione a dosaggi adeguati può esitare in marcati effetti

citotossici: il suo spiccato tropismo infatti, ne permette una marcata concentrazione in sede tumorale con produzione di livelli molto elevati di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> che si esplicano in imponente necrosi.

Oltretutto, grazie alla sua specificità la rMnSod rappresenta senza ombra dubbio un'arma importantissima nella diagnostica precoce e ciò stimola studi sempre più approfonditi sul suo utilizzo per esempio nella cosiddetta “multi-chemioterapia” in associazione con chemioterapici tradizionali (Cisplatino, Ciclofosfamide, Adriblastina ecc.) e con la radioterapia. Quest'ultima come già accennato, potrebbe ancora di più avvalersi della proteina come “carrier” per sostanze betaemittenti concentrate direttamente all'interno delle cellule maligne. E' nelle nostre aspettative l'impiego di una camera calda in cui contenere per un periodo di circa 48 ore pazienti affetti da neoplasie mammarie Es+ trattati con somministrazioni endovenose di rMnSod legata a radiofarmaci capaci di liberare la propria radioattività una volta a contatto col citoplasma delle strutture cancerose.

Nella nostra ricerca, l'azione terapeutica della proteina è stata valutata solo nel periodo iniziale ed in maniera parziale in virtù delle suesposte problematiche subentrate, riguardanti soprattutto le ulcere superficiali con conseguente ricorso alla chirurgia. In tal senso, la somministrazione mirata e messa prioritariamente in relazione con interventi di mastectomia radicale clinicamente gestiti e correttamente stabiliti, potrebbe permettere un uso della rMnSod in stretta correlazione con i trattamenti perioperatori routinari.

Allo stato attuale dei lavori, l'obiettivo degli autori è oggi puntato sulle modalità di ottimizzazione dell'uso della molecola sia in ambito diagnostico (stiamo valutando di concerto con colleghi biochimici la possibilità di legare la Sod a mezzi di contrasto

ecografici) che terapeutico ed in tal senso continuano le acquisizioni di immagini su animali padronali affetti da neoplasie spontanee presso il reparto di Medicina Nucleare dell'Ospedale “Pascale” di Napoli.



## Capitolo 5

### COMMENTO E CONCLUSIONI (5-1)

Alla luce dei promettenti risultati ottenuti si può sicuramente affermare che gli obiettivi prefissati per questa fase della ricerca sono stati raggiunti; la selettività della rMnSod è risultata evidente tanto nell'aspetto diagnostico grazie alla sua caratteristica di concentrarsi nelle sedi tumorali sensibili in misura esponenzialmente maggiore rispetto ad altri siti, quanto in quello terapeutico per la totale assenza di manifestazioni collaterali o comunque indesiderate. D'altro canto, la marcata specificità della proteina ed il suo tropismo per lesioni anche di estensione modesta (1-2 cm) sono state rese evidenti nel momento in cui lesioni di diametro inferiore ai 3 cm sono risultate captive alle indagini radio-diagnostiche.

### UTILIZZO DEI MARKER IN VETERINARIA (5-2)

Allo stato attuale, in Medicina Veterinaria l'utilizzo dei marker tumorali in oncologia è ancora in fase embrionale (Zaidan-Dagli, 2008) anche se sono accettati dalla bibliografia internazionale numerosi fattori capaci di chiarire la natura cancerosa (Zacchetti, 2003) e la prognosi infausta di determinate lesioni (Pereira, 2003); le difficoltà nelle determinazioni speciespecifiche ed i costi di gestione e manutenzioni di apparecchiature usate per la loro valutazione rendono spesso impossibile alla pratica clinica routinaria la messa in evidenza di tali marcatori tumorali.

La rMnSod si è dimostrata chimicamente molto attiva e abbastanza agevole da legare stechiometricamente a substrati capaci di metterne in luce la captazione nelle sedi mammarie colpite da processi morbosi a carattere canceroso e pertanto il suo utilizzo per esempio nella metodica ultrasonografica (somministrata per via endovenosa e legata ad

un mezzo di contrasto adatto) può sicuramente suscitare notevole interesse per la possibilità di diagnosi precisa e precoce di malattia tumorale.

Inoltre, in relazione alla scarsa espressione recettoriale mostrata dalle forme a maggiore aggressività di neoplasie mammarie epiteliali come il carcinoma infiammatorio o il carcinoma indifferenziato (Roldan, 2006), la proteina in esame può essere impiegata come predittore di evoluzione e prognosi delle neoplasie per le quali venga utilizzato. Una eventuale scarsa o assente captazione può infatti deporre per una notevole dedifferenziazione cellulare che a sua volta rappresenta un indice di comportamento biologico particolarmente aggressivo della patologia.

#### PROSPETTIVE DI STUDIO (4-3)

Tutto ciò stimola senza dubbio l'approfondimento degli studi riguardo a numerose aspetti ancora poco noti della molecola. La casistica ancora abbastanza limitata e la carenza di attrezzature diagnostiche adeguate non hanno permesso infatti di stabilire alcuni meccanismi d'azione come per esempio i tempi e le modalità con cui la rMnSod interagisce coi recettori per estrogeni e le circostanze poco chiare che potenziano o riducono la concentrazione del farmaco nelle masse. Inoltre il numero ancora esiguo di pazienti sottoposti ai trattamenti sperimentali non concede certezze sull'uso clinico del farmaco.

Per quanto riguarda l'utilizzo diagnostico della proteina, è attualmente in fase di studio un progetto che permetta l'uso della molecola in associazione a mezzi di contrasto per indagini routinarie (come l'ecografia) e “screening” di massa sia nell'uomo che negli animali domestici. La possibilità di fare diagnosi precoci di neoplasia mammaria su larga scala consentirebbe anche approfondite ricerche di epidemiologia così come azioni di

prevenzione miranti a ridurre l'esposizione ad agente cancerogeni nel caso dei pazienti maggiormente a rischio di sviluppare malattie tumorali. In parallelo con studi di biodistribuzione ed efficacia terapeutica nelle forme di neoplasie mammarie non aggredibili chirurgicamente, stiamo valutando l'associazione della rMnSOD con mezzi di contrasto iodati da somministrare in infusione endovenosa prima della visualizzazione ultrasonografica e color-doppler del tessuto ghiandolare mammario per ottenere informazioni sulla vascolarizzazione e su eventuali variazioni nel "pattern" tissutale, indici precoci di spostamento in senso neoplastico dell'organo.

Di estremo interesse scientifico, in base ai risultati finora ottenuti, è poi l'ipotesi di utilizzare la proteina in esame come vettore specifico e selettivo per veicolare direttamente all'interno delle cellule neoplastiche grandi concentrazioni di radiofarmaci. Come accennato, in tal senso le ricerche sono ancora in fase di stallo per la mancanza di attrezzature (la cosiddetta camera calda) in cui contenere i pazienti trattati per circa 48 ore per evitare che diffondano radioattività con le deiezioni. Riteniamo che una volta messa a punto una beta-emittenza intralesionale, possano essere sufficienti poche somministrazioni endovenose di rMnSod radiomarcata (l'ipotesi più accreditata è quella di ripetere l'infusione una sola volta a settimana per tre o quattro cicli massimo) a ridurre se non addirittura eliminare le lesioni cancerose sensibili sia in sede mammaria che metastatica.

#### UTILIZZO TERAPEUTICO (4-4)

E' tuttora in fase sperimentale l'utilizzo della proteina come "carrier" per trattamenti di chemioterapia mirati alle singole formazioni cancerose; attualmente stiamo utilizzando microdosaggi di cisplatino, in monochemioterapia o in associazione a doxorubicina

incapsulati in 1 milligrammo di rMnSOD inoculata per via endovenosa dopo staging diagnostico completo.

Dopo il trattamento stiamo valutando per via ecografia i cambiamenti di struttura a carico delle masse tumorali sia in fatto di angiogenesi che di consistenza ed ultrastruttura. L'obiettivo prefissato è quello di ottenere una riduzione volumetrica (se non addirittura una scomparsa come avvenuto negli esperimenti in laboratorio su topini nudi tumore-indotti) delle lesioni cancerose sia mammarie che metastatiche, sfruttando la proteina come "carrier" intracellulare che permetta di ottimizzare l'azione citotossica del farmaci e al tempo stesso di minimizzarne gli effetti collaterali sulle altre cellule dell'organismo.

## RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

**Ravdin PM, Cronin KA, Howlader N, Berg CD, Chlebowski RT, Feurer EJ, Edwards BK, Berry BA** (2007) “The decrease in breast cancer incidence in 2003 in the United States” *N. Engl. Jour. Med.* , Vol 356, 1670-1674

**Engenvall A, Bonnett BN, Ohagen P, Olson P, Hedhammar A, von Heuler H** (2005) “Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002” *Preventive Veterinary Medicine*, Vol 69, Issue 1-2, 109-127

**Mattheeuws D, Rottiers R, Finjan K, Vermeulen A** (2008) “The influence of oestrus cycle on the intravenous glucose tolerance test in the bitch” *Journal of Small Animal Practice*, Vol 25, Issue 12, 753-757

**Doleiel R, Kyliankova R, Kummer V, Makova J, Stara P, Vitasek R** (2004) “Follicular population and oestrogen receptors alpha in ovary of the bitch” *ACTA VET BRNO*, Vol 73, 37-43

**Riganti JC**, (2001) “Risk of presenting ovarian alterations in bitches with mammary tumors” *WSAVA congress 2001*.

**Mol JA, van Garderen E , Selman PJ, Wolfswinkel J, Rijnberk A, Rutteman GR** (1995) “Growth hormone mRNA in mammary gland tumors of dogs and cats”.

**M Perrot-Applanat, F Logeat, MT Groyer-Picard and E Milgrom** (1985) “Immunocytochemical study of mammalian progesterone receptor using monoclonal antibodies” *Endocrinology*, Vol 116, 1473-1484

- van Garderen E., van der Poel H.J.A., Swennenhuis J.F. , E., Wissink,H. J. , G.R. Rutteman, Hellmén E., Mol J.A., J.A. Schalken** (1999) “Expression and Molecular Characterization of the Growth Hormone Receptor in Canine Mammary Tissue and Mammary Tumors ” *Endocrinology Vol. 140, No. 12 5907-5914*
- Pereira T. , Rahal S. C. , de Carvaglio C. , Ribeiro M.** (2003) “Lymphatic Drainage on Healthy and Neoplastic Mammary Glands in Female Dogs” *Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C Volume 32 Issue 5 Page 282.*
- Cadiou E., Ostrander E.A.** (2007) “Canine Genetics Offers New Mechanisms for the Study of Human Cancer” *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention 16, 2181-2183*
- Owen LN,** (1979), “A comparative study of canine and human breast cancer.” *Invest Cell Pathol. 1979 Oct-Dec;2(4):257-75.*
- Hansen N.M., Xing Y., Grube B.J. , Giuliano A.E.** (2004) “Manipulation of the Primary Breast Tumor and the Incidence of Sentinel Node Metastases From Invasive Breast Cancer” *Archives of Surgery*, vol 139 no6, 634-640.
- Rutteman GR, Withrow SJ, MacEwen EG** (2001) “Tumors of the mammary gland” *IN: Small Animal Clinical Oncology, eds. Withrow SJ, MacEwen EG, 3rd ed., pp 455-477.*
- Sarli G., Preziosi R., Benazzi C., Castellani G., Marcato PS,** (2002) “Prognostic value of histologic stage and proliferative acitivity in canine malignant mammary tumors” *J Vet Diagn Invest 14: 25-34*

**Hahn KA, Richardson RC, Knapp DW** (1992) “Canine malignant mammary neoplasia: biological behavior, diagnosis and treatment alternatives”. *J Am Anim Hosp Assoc* 28:251-56.

**Misdorp W** (2002) “Tumors of the mammary gland. IN: Tumors in Domestic Animals” *ed. Meuten DJ, 4th ed. pp 575-606. Iowa State Press, Ames, IA*

**Dorè M, Lanthier I, Sirois J** (2003) “Cyclooxygenase-2 Expression in Canine Mammary Tumors” *Vet Pathology, Vol 40, pag 207-212*

**Benjamin SA, Lee AC, Saunders WJ** (1999) “Classification and behaviour of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles” *Vet Pathology, Vol 36, pag 423-436*

**Page R.** (2001) “Prognostic Factors for Canine and Feline Mammary Cancer”. *WSAVA congress*

**Philibert JC, Snyder PW, Glickman N, Glickman LT, Knapp DW, Waters DJ** (2003) “Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors”. *J Vet Intern Med* 17: 102-106.

**Tiemessen I.** (1989) “Thoracic metastases of canine mammary gland tumors” *Veterinary Radiology & Ultrasound* Volume 30 Issue 6 Page 249.

**Elling H, Ungemack FR** (2004) “Simultaneous occurrence of receptors for estradiol, progesterone, and dihydrotestosterone in canine mammary tumors “ *Journal of cancer research and clinical oncology.*

- Shao W. , Brown M.** (2004) “Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy” *Breast Cancer Research*, 6 (1), 39-52
- Nieto A. , Peña L., Pérez-Alenza M. D., Sánchez M. A., Flores J. M. and Castaño M.** (2000) “Immunohistologic Detection of Estrogen Receptor Alpha in Canine Mammary Tumors: Clinical and Pathologic Associations and Prognostic Significance” *Vet Pathol* 37:239-247
- De Las Mulas M, Ordás J.;Millán Y.;Fernández-Soria V.;Ramón y Cajal S.** (2003), «Oncogene HER-2 in Canine Mammary Gland Carcinomas» *Breast Cancer Research and Treatment*, Volume 80,Number 3,
- Bishop JM** (1987) “The molecular genetics of cancer” *Science* 235, 305-311
- Bagheri-Yarmand R, Starzec A, Vassy R, Perret G,** (2003) “Prevention of breast tumor angiogenesis and metastasis by cytostatic molecules in relevant mouse models” *Breast Cancer Research* 5 (1) 52
- Evenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA,** (1993) “Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis” *Annu Rev Cell Biol*, 9, 541-573
- Arbiser JL, Petros J, Klafter R, Govindajaran B, McLaughlin ER, Brown LF, Cohen C, Moses M, Kilroy S, Arnold RS, Lambeth JD,** (2002) “Reactive oxygen generated by Nox-1 triggers the angiogenic switch” *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 715-720
- Oberley TD, Xue Y, Zhao Y, Kiningham K, Szweda LI, St Clair DK,** (2004) “In situ reduction of oxidative damage, increased cell turnover, and delay of mitochondrial injury by overexpression of manganese superoxide dismutase in a multistage skin carcinogenesis model” *Antioxid Redox Signal*, 6, 537-548



**Tzu-Chao C., Jah-Yao L., Chi-Tsai L. et al. (2007)** “Human manganese superoxide dismutase suppresses HER2/neu-mediated breast cancer malignancy”. *FEBS Letters* 581 4443-4449

**Mancini A, Garbi C, D'Armiento F, Borrelli A, Ambesi-Impiombato FS, (1991)** “Culture and cloning of an adipocytes cell line from a human liposarcoma” *Boll Ist Tum Napoli*, 38, 43-49

**Mancini A, Borrelli A, Schiattarella A, Fasano S, Sehr P, Occhiello A, Pica A, Tommasino M, Nuesch JPF, Rommelaere J (2006)** “Tumor suppressive activity of a novel isoform of Mn-Superoxide-dismutase released by a human liposarcoma cell line” *Int Jou of Cancer*, March, 20.

**Mancini A, Borrelli A, Schiattarella A, Aloj L, Lorizio R, Sica et al (2007)** “Characterization of a Liposarcoma Derived Recombinant MnSOD Easily Administrable and Acting as Anticancer Agent” *Journal of Biological Chemistry*, in print

**So Won Oh, Won Jun Kang et al (2007)** “Screening of second primary cancer at the time of the initial tumor staging using positron emission tomography” *J Nucl Med.*; 48 (Supplement 2):379P

**Nelson KW, Kelly WA (1974)** “Changes in canine mammary gland histology during estrous cycle” *Toxicol Appl Pharmacol.* 1974 Jan;27(1):113-22

**Todorova I (2006)** “Prevalence and etiology of the most common Malignant tumours in dogs and cats” *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine (2006)*, 9, No 2, 85–98

**Jefford C, Irminger-Finger I (2006)** “Mechanisms of chromosome instability in cancers” *Critical Reviews in Oncology/Hematology* , Volume 59 , Issue 1 , Pages 1 - 14

- Zavadil J, Cermak L, Soto-Nieves N, Bottinger EP** (2004) “Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition” *The European Molecular Biology Organization Journal*, 23, No 5, 1155–1165
- Spandidos DA** (1985) “Mechanism of carcinogenesis: the role of oncogenes, transcriptional enhancers and growth factors” *Anticancer research*, Vol 5, N 5, pag 485-498
- Loeb KR, Loeb LA** (2000) “Significance of multiple mutations in cancer” *Carcinogenesis*, Vol 21, N 3, pag 379-385
- Ghosh B, Bose I** (2005) “Gene copy number and cell cycle arrest” *Physical Biology*, Vol 3, N 1, pag 29-36
- Wakui S, Muto T, Yokoo K, Yokoo R, Takahashi H, Masaoka T, Hano H, Furusato M** (2001) “Prognostic status of p53 gene mutation in canine mammary carcinoma” *Anticancer Research*, Vol 21, pag 611-616
- Schafer KA, Kelly G, Schrader R, Griffith WC, Muggenburg BA, Tierney LA, Lechner JF, Janovitz EB, Hahn FF** (1998) “A canine model of familial mammary gland neoplasia” *Vet Pathology*, Vol 35, N 3, pag 168-177
- Cullen JM, Page R, Misdorp W** (2002) “An overview of cancer pathogenesis, diagnosis and management” *Tumors in domestic animals*, ed DJ Meuten, Blackwell PC, pag 3-45
- Rodney L, Page MS** (2001) “Prognostic factors for canine and feline mammary cancer” *Proceedings of Atlantic Coast Veterinary Conference, Octobre 9-11, 2001*
- Madewell BR, Theilen GH** (1987) “Etiology of cancer in animals” *Veterinary cancer medicine, second edition*, pag 13

- Sourvinos G, Tsatsanis C, Spandidos DA** (2000) "Mechanism of retrovirus-induced oncogenesis" *Folia Biologica*, Vol 46, N 6, pag 226-232
- Wild CP, Kleihues P** (1996) "Etiology of cancer in human and animals" *Experimental Toxicology and Pathology*, Vol 48, pag 95-100
- Ames BN, Profet M, Gold LS** (1990) "Nature's chemicals and synthetic chemicals: comparative toxicology" *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America*, 87, 7782-7786
- Guzman E, Langowski JL, Owen-Schaub L** (2003) "Mad dogs, Englishmen and apoptosis: the role of cell death in UV-induced skin cancer" *Apoptosis*, Vol 8, N 4, pag 315-322
- Biaglow JE** (1981) "The effects of ionizing radiation of mammalian cells" *Journal of Chemical Education*, Vol 58, pag 144-156
- Lloyd RD, Bruenger FW, Taylor GN, Miller SC** (2005) "Search for a genetic link for mammary cancer in beagle colony" *In vivo*, Vol 19, N 7, pag 723-727
- Rosenthal RC** (1998) "Mechanism of invasion and metastasis" *Clinical Veterinary Oncology*, eds SJ Withrow, EG Mac Ewen, pag 23-28
- Schneider R, Dorn CR, Taylor DO** (1969) "Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival" *J Nat Cancer Inst*, Vol 43, Issue 6, pag 1249-1261
- Van Gardener E, De Wit M, Voorhout WF, Rutteman GR, Mol JA, Nederbragt H, Misdorp W** (1997) "Expression of growth hormone in canine mammary tissue and mammary tumors. Evidence for a potential autocrine/paracrine stimulatory loop" *Am J of Pathology*, Vol 150, N 3, pag 1037-107

**Selman PJ, Mol JA, Rutteman JA, van Gardener E, Rijnberk A** (1994) “Progestin-induced growth hormone excess in the dog originates in the mammary gland” *Endocrinology*, Vol 134, N 1, pag 287-292

**Fernig DJ, Smith JA, Rudland PS** (1991) “Relationship of growth factors and differentiation in normal and neoplastic development of the mammary gland” *Cancer Treat Res*, Vol 53, pag 47-78

**Jammes H, Gaye P, Belair L, Djiane J** (1991) “Identification and characterization of growth hormone receptor mRNA in the mammary gland” *Mol Cell Endocrinol*, Vol 75, N 1, pag 27-35

**Rutteman GR, Misdorp W, Blankenstein MA, van der Brom WE** (1988) “Oestrogen (ER) and progestin receptor (PR) in mammary tissue of the female dog: different receptor profile in non-malignant and malignant states” *Br J cancer*, Vol 58, N 5, pag 594-599

**Lombardi P, Florio S, Pagnini U, Crispino A, Avallone L** (1999) “Ovarian function suppression with a GnRH-analogue: D-ser(but[t])[6]arzgly[10]-LHRH (Goserelin) in hormone dependent canine mammary cancer” *JVet Pharmacol Ther*, Vol 22, N 1, pag 56-61

**Pagnini U, Florio S, Crispino L, Pagnini G, Colangelo D, Rocco D, Pacilio C, Pacilio M, Macaluso M, Giordano A** (2002) “Direct effect of a gonadotropin-releasing hormone agonist on the growth of canine mammary tumor cells” *Journal of Cellular Biochemistry*, Vol 85, Issue 3, pag 470-481

**Sorenmo K** (2003) “Canine mammary gland tumors” *Small animals practice*, Vol 33,

**De Las Mulas M, Millàn Y, Dios R** (2005) “A Prospective Analysis of Immunohistochemically Determined Estrogen Receptor and Progesterone Receptor Expression and Host and Tumor Factors as Predictors of Disease-free Period in Mammary Tumors of the Dog” *Vet Pathol* 42:200-212

**Schellingerhout D, Accorsi R, Mahmood U, Idoine J, Lanza RC, Weissleder R.** (2002) “Coded aperture nuclear scintigraphy: a novel small animal imaging technique”. *Mol. Imaging* ; 1(4):344-53.

**Lewis J., Achilefu S., Garbow J., Laforest R., Welch M.** (2002) “Small animal imaging: current technology and perspectives for oncological imaging. *European Journal of Cancer*”, Vol. 38, 16, 2173-2188.

**Waldron DR** (2001) “Diagnosis and surgical management of mammary neoplasia in dogs and cats” *Vet Med* 96: 943-948

**Del Moa RM, Nguyen AV, Lin YE, Ping L, Mani J, Blafox MD, Polland JV, Dadachova E** (2003) “Positron emission tomography agent 2-deoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluoro-D-glucose has a therapeutic potential in breast cancer” *Breast Cancer Res* 2003, 5:R199-R205doi:10.1186/bcr643

**Cassali GD, Gobbi H, Malm C, Schmitt FC** (2007) “Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis of canine mammary tumours: comparative features with human tumours” *Cythopatology*, Vol 18, Issue 3, 191-196

**Ferreira E.; Bregunci G.C.; Schmitt F.C.; Cassali G.D.** (2003) “Protocol for the anatomopathological examination of canine mammary tumors”. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. vol.55,no.1,Belo Horizonte*.

- Scharz M, Ohlerth S, Achermann R, Gardelle O, Roos M, Saunders HM, Wergin M, Kaser-Hotz B** (2005) "Evaluation of quantified contrast-enhanced color and power Doppler ultrasonography for the assessment of vascularity and perfusion of naturally occurring tumors in dogs" *American Journal of Veterinary Research*, Vol 66, N1, 21-29
- Kaser-Hotz B, Hauser B, Arnold P** (2005) "Ultrasonographic findings in canine gastric neoplasia in 13 patients" *Veterinary Radiology and Ultrasound*, Vol 37, Issue 1, pag 51-56
- McCulloch M** (2006), "Diagnostic Accuracy of Canine Scent Detection in Early- and Late-Stage Lung and Breast Cancers" *Integrative Cancer Therapies*, Vol. 5, No. 1, 30-39
- Marti J. A.** (2002) "Vaginal Cytology in the Bitch and Queen". *WSAVA Congress*.
- Inoue M, Shiramizu K** (1999) "Immunohistochemical detection of p-53 and c-myc proteins in canine mammary tumors" *Journa of Comparative Pathology*, Vol 120. Issue 2, pag 169-175
- Schellingerhout D, Accorsi R, Mahmood U, Idoine J, Lanza RC, Weissleder R** (2002) "Coded Aperture nuclear scintigraphy: a novel small animal imaging technique" *Molecular Imaging*. 1(4):344-353.
- Herschman H** (2003) "Micro-PET imaging and small animal models of disease" *Current Opinion in Immunology*, Vol 15, Issue 4, pag 378-384
- Novosad A** (2003) "Principles of treatment for mammary gland tumors " *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, Vol 18. Issue 2, pag 107-109
- Sarrau S, Jourdan J, Dupuis-Soyris F, Verwaerde P** (2007) "Effects of postoperative ketamine infusion on pain control and feeding behaviour in bitches undergoing

mastectomy” *Journal of Small Animal Practice*, Vol 48, Issue 12, pag 670-676

**Hoektra JW, Dronen SC, Hedges JR** (1988) “Effects of splenectomy on hemodynamic performance in fixed volume canine hemorrhagic shock”. *Circ Shock*, Vol 25, Issue 2, pag 95-101

**Zaidan-Dagli ML** (2008) “The search for suitable prognostic markers for canine mammary tumors: a promising outlook” *The Veterinary Journal*, Vol 177. Issue 1, pag 3-5

**Zacchetti A, Van Garderen E, Tieske E, Nederbragt H, Dierendonk JH, Rutteman GR** (2003) “Validation of the use of proliferation markers in canine neoplastic and non-neoplastic tissues: comparison of KI-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression versus in vivo bromodeoxyuridine labelling by immunohistochemistry” *Ampis*, Vol 111, N 3, pag 430-438

**Pereira KS, Zuccari DA, Cury PM, Cordeiro JA** (2003) “Apoptosis as a prognostic factor in canine mammary tumor by TUNEL” *Braz Journ of Research and Animal Science*, Vol 40, pag 359-365

**Roldan G, Delgado L, Musè IM** (2006) “Tumoral expression of BRCA1, estrogen receptor alpha and ID4 protein in patients with sporadic breast cancer” *Cancer Biol Ther*, Vol 5, N 5, 16582598